

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger

An der
Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München
Institut für experimentelle Anästhesie
(Dr. med. Bettina Jungwirth)

**ZUM EINFLUSS VON GESCHLECHT UND
GESCHLECHTSHORMONSTATUS AUF NEUROLOGISCHE
UND NEUROKOGNITIVE FUNKTIONEN SOWIE AUF DIE
GEHIRNMORPHOLOGIE 14 TAGE NACH
HERZCHIRURGISCH TYPISCHER
EXTRAKORPORALER ZIRKULATION MIT
45-MINÜTIGEM TIEF HYPOTHERMEM
KREISLAUFSTILLSTAND IM RATTENMODELL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stefan Friedrich
aus
Schalders

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Meiner Oma Schabs und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Kognition	2
2.1.1	Neurokognition und Gedächtnis	2
2.1.2	Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnis	2
2.1.3	Langzeitgedächtnis	4
2.1.3.1	Deklaratives Gedächtnis	5
2.1.3.2	Nicht- deklaratives Gedächtnis	5
2.2	Biologische Vergleichbarkeit von Nagetiermodell und Mensch	7
2.2.1	Testsysteme zur Untersuchung der Neurokognition	9
2.2.1.1	„Open Field“ Test	9
2.2.1.2	„Morris-Water-Maze“ Test	10
2.2.1.3	„Hole-Board“- Test	11
2.3	Zur extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA)	13
2.3.1	Anwendung	13
2.3.2	Pathophysiologische Gegebenheiten	15
2.4	Geschlechtsunterschiede in der Erfolgsrate herzchirurgischer Maßnahmen	17
2.4.1	Physiologie der Geschlechtshormone	18
2.4.1.1	Östrogene	21
2.4.1.2	Progesteron	24
2.4.1.3	Testosteron	25
2.4.2	Klinische Humanstudien	26
2.4.3	Tierexperimentelle Studien	27
3	Eigene Untersuchungen	28
3.1	Zielvorstellung	28
3.2	Material und Methoden	29
3.2.1	Versuchsplanung	29
3.2.2	Versuchsdurchführung	33
3.2.2.1	Kastration bzw. Scheinkastration	33
3.2.2.1.1	Weibliche Tiere	33
3.2.2.1.2	Männliche Tiere	34
3.2.2.2	Extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA)	36
3.2.2.2.1	Chirurgische Präparation sowie technische Vorbereitung und Durchführung der EKZ	36
3.2.2.2.2	Technische Vorbereitung und Durchführung des DHCA	39
3.2.2.2.3	Nachbehandlungsmaßnahmen	40
3.2.2.2.4	Probenentnahme und Analysen vor, während und nach EKZ und DHCA	41

3.2.2.3	Neurologisch- motorische Untersuchungen	42
3.2.2.3.1	Bewusstsein.....	43
3.2.2.3.2	Pflegeverhalten.....	43
3.2.2.3.3	Laufen/ Bewegung.....	43
3.2.2.3.4	Laufen auf dem Balken („Beam Walking“).	44
3.2.2.3.5	Gitter- Dreh- Test („Rotating Grid“).....	45
3.2.2.3.6	Balken- Gleichgewichts- Test (“Beam Balance”)	46
3.2.2.3.7	Greif- Zug- Test („Prehensile Traction“).....	47
3.2.2.3.8	Sensorik- Test.....	48
3.2.2.3.9	Gewichtskontrolle.....	48
3.2.2.4	Modifizierter Zylinder Hole Board Test (mZHBT).....	50
3.2.2.4.1	Testprinzip.....	50
3.2.2.4.2	Technische Ausstattung.....	50
3.2.2.4.3	Versuchsplan.....	54
3.2.2.4.4	Versuchsablauf.....	55
3.2.2.4.5	Erhobene Parameter.....	57
3.2.2.4.5.1	Kognitive Parameter.....	57
3.2.2.4.5.2	Motorische Parameter.....	57
3.2.2.4.5.3	Verhaltensparameter.....	57
3.2.2.5	Euthanasie und Probenentnahme	60
3.2.2.6	Bestimmung der Geschlechtshormonkonzentration	60
3.2.2.7	Histologische Untersuchungen.....	61
3.2.2.8	Statistische Grundlagen der Auswertung.....	63
4	Ergebnisse.....	64
4.1	Parametrische physiologische Befunde vor, während und nach EKZ und DHCA.....	64
4.2	Geschlechtshormonspiegel an Tag 14 nach EKZ und DHCA.....	65
4.3	Körpergewichtsentwicklung.....	69
4.4	Tierausfälle und Tierersatz	72
4.5	Neurologische Befunde.....	75
4.5.1	Sensorik.....	75
4.5.2	Laufen auf dem Balken („Beam Walking“).	77
4.5.3	Balken- Gleichgewichts- Test (“Beam Balance”)	79
4.5.4	Greif- Zug- Test („Prehensile Traction“).....	81
4.5.5	Gitter- Dreh- Test („Rotating Grid“).....	83
4.6	Befunde beim modifizierten Zylinder Hole Board Test (mZHBT).....	85
4.6.1	Kognitive Parameter.....	85
4.6.1.1	Durchlaufgesamtzeit („Time Complete“).....	85
4.6.1.2	Fehlbesuche („Wrong choices“).....	87
4.6.1.3	Auslassungsfehler („Omission errors“).....	89
4.6.1.4	Wiederholungsfehler („Repeated choices“).....	91
4.6.2	Motorische Parameter.....	93
4.6.2.1	Fresszeit („Time per food intake“).....	93

4.6.2.2	Frustrane Lochbesuche („Frustrane hole visits“)	95
4.6.3	Verhaltensparameter	97
4.6.3.1	Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch („Latency first entry board“)	97
4.6.3.2	Latenzzeit zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders („Latency visit first baited hole“)	99
4.6.3.3	Auf dem Board verbrachte Zeit („Time on Board“)	101
4.6.3.4	Immobilität („Immobility“)	103
4.6.3.5	Besuche befüllter Zylinder („Number of visits baited hole“)	105
4.6.3.6	Boardbesuche („Number of board entries“)	107
4.6.3.7	Gruppenkontakte („Group contact“)	109
4.6.3.8	Rearing	111
4.6.3.9	Putzphasen („Grooming“)	113
4.6.3.10	Linienquerungen („Line crossing“)	115
4.7	Histologische Befunde	117
5	Diskussion	119
5.1	Diskussion der Methoden	119
5.1.1	Zum Rattenmodell der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA)	119
5.1.2	Zur Eignung der neurologischen Untersuchungen	122
5.1.3	Zur Eignung des modifizierten Zylinder Hole Board Tests (mZHBT)	124
5.1.4	Zur histologischen Darstellung neuronaler Schäden	125
5.2	Diskussion der Ergebnisse	126
5.2.1	Parametrische und endokrine physiologische Befunde	126
5.2.2	Neurologisch- motorische Befunde	126
5.2.3	Befunde zu Neurokognition und Verhalten	130
5.2.4	Histologische Befunde	131
5.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick	132
6	Zusammenfassung	133
7	Summary	135
8	Literaturverzeichnis	137
9	Tabellenverzeichnis	150
10	Abbildungsverzeichnis	152
11	Abkürzungsverzeichnis	155
12	Danksagung	158

1 Einleitung

Geschlechtsunterschiede in der Erfolgsrate herzchirurgischer Maßnahmen sind ein weitläufig beschriebenes und bekanntes Phänomen. Frauen haben dabei eine höhere Morbiditäts- und Mortalitätsrate als Männer. Die Pathophysiologie berücksichtigend werden mehrere Risikofaktoren genannt: Zunächst das durchschnittlich höhere Alter bei Frauen, in dem sie mit Herzproblemen vorstellig werden. Dieses höhere Alter führt wiederum zu einem höheren Risiko von Neben- und Begleiterkrankungen, wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Atherosklerose (EDWARDS et al., 1998; VACCARINO et al., 2002). Zudem haben Frauen im Schnitt eine geringere Körperoberfläche und folglich auch ein geringeres Blutvolumen als Männer und benötigen bei Operationen mehr Bluttransfusionen (RANUCCI et al., 2008). Doch auch unabhängig der eben genannten Risikofaktoren bleibt das weibliche Geschlecht mit einem erhöhten Risiko von postoperativen Komplikationen, Rückfällen und einer allgemein verminderten Lebensqualität nach herzchirurgischen Eingriffen verbunden (GURU et al., 2006; ALAM et al., 2012). Als diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden zugrunde liegende Ursachen werden sowohl genetische als auch hormonelle Einflüsse diskutiert. Neben den oben genannten Unterschieden verhält sich auch das zerebrale Outcome zwischen Männern und Frauen geschlechtsspezifisch (GURU et al., 2006). Geschlechtshormone und ihre Abbauprodukte sind bekannt dafür, im Gehirn Neurone und/oder den zerebralen Stoffwechsel zu beeinflussen. Dabei agieren Progesteron und Testosteron als sog. „Neurosteroid“ und können neben der neuronalen Exzitabilität u.a. auch die Gentranskription beeinflussen (MELCANGI und MENSAH-NYAGAN, 2008; ZHENG, 2009). Östrogene, insbesondere 17 β -Östradiol beeinflussen im Hippokampus Feinmotorik, Gemütslage, Erinnerungsmechanismen und die Kognition (WOOLLEY et al., 1990; POZZI et al., 2006).

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es deshalb, nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation mit 45 min tief hypothermem Kreislaufstillstand bei Ratten, den Einfluss von Geschlecht und Hormonstatus auf das neurologische und neurokognitive Outcome in vivo sowie auf die neuronale Morphologie post mortem zu untersuchen.

2 Schrifttum

2.1 Kognition

2.1.1 Neurokognition und Gedächtnis

Der Begriff Kognition (von lat. „cognoscere“: „erkennen“, „kennenlernen“) bezeichnet die mentalen Prozesse mit den zugehörigen Strukturen eines Individuums, welche mit Wahrnehmung, Denken, Lernen, Erinnern und Erkennen in Zusammenhang stehen (BROCKHAUS-ENZYKLOPÄDIE, 1998). Kognition wird demnach als Synonym für die Informationsverarbeitung im zentralen Nervensystem verwendet. Diese Informationsverarbeitung bildet die Grundlage menschlichen Verhaltens als Reaktion auf Umweltreize. Sie ermöglicht uns, diese Umweltreize wahrzunehmen, zu verstehen, zu interpretieren, unser Verhalten anzupassen und so durch zielgerichtetes und planerisches Handeln in unserer Umwelt zurecht zu kommen. Wichtigstes „Instrument“ der Kognition ist dabei das Gedächtnis. Dieses besteht aus mehreren Systemen, welche in verschiedenen Hirnregionen lokalisiert sind (SQUIRE, 1992; ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1993). Das Gedächtnis lässt sich nach unterschiedlichen Kriterien definieren und entsprechend differenzieren. So unterscheidet man -chronologisch betrachtet-, das Lang- vom Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnis, sowie - funktionell betrachtet-, das anterograde (sog. „Neugedächtnis“) vom retrograden (sog. „Altgedächtnis“) Gedächtnis. Das anterograde Gedächtnis bezieht sich demnach auf das erfolgreiche Einspeichern und Ablegen neuer Informationen (Erlernen), das wiederholte Abrufen schon erfolgreich abgespeicherter Daten charakterisiert das retrograde Gedächtnis, also das Erinnern (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).

2.1.2 Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnis

Nach neueren Erkenntnissen tritt eine Unterscheidung von Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis zunehmend in den Hintergrund (BERTI, 2010). Anstatt die beiden Begriffe getrennt voneinander zu betrachten, fasst man diese beiden Gedächtnissysteme in einem Komplex von mehreren informationsverarbeitenden Komponenten zusammen. Zunächst wurde ein temporärer Kurzzeitspeicher postuliert (BROWN, 1958). Doch bereits 1968 entwickelten ATKINSON und SHIFFRIN ein Zwei-Komponenten-Modell (ATKINSON, 1968), welches schließlich von BADDELEY und HITCH 1974 zu einem Drei-Komponenten-Modell

weiterentwickelt wurde. Dieses Modell setzt sich aus einem visuell räumlichen Skizzenblock, der phonologischen Schleife und einem übergeordneten Kontrollzentrum, der zentralen Exekutive, zusammen. Zuletzt fügte BADDELEY diesem Modell noch eine weitere Komponente, den episodischen Speicher als Schnittstelle zum Langzeitgedächtnis hinzu (BADDELEY et al., 2002).

Informationen müssen zunächst selektiv gefiltert werden, um anschließend reflektiert werden zu können. Als oberste Schaltzentrale übernimmt diese koordinierende Aufgabe die im Lobus frontalis lokalisierte, sog. „**zentrale Exekutive**“ des Arbeitsgedächtnisses (BADDELEY, 1998).

Visuelle Informationen wie Form und Farbe speichert der sog. „**visuell- räumliche Skizzenblock**“ ab, lokalisiert, vor allem in einer bestimmten Region des Lobus okzipitalis, hauptsächlich in der rechten Hemisphäre. Räumliche Informationen wie z. B. die Anordnung von Gegenständen im Raum (BADDELEY, 1998; TOEPPER et al., 2010) und kinästhetische Informationen wie z.B. die Laufrichtung werden überwiegend im Lobus frontalis verarbeitet (BADDELEY, 2000).

Akustische und sprachbasierte Informationen verarbeitet vorwiegend in einem temporären Speicher die sog. „**phonologische Schleife**“ (BADDELEY, 1996).

Der sog. „**episodische Speicher**“ fungiert als Verknüpfungsstelle für Informationen verschiedenster Herkunft und ist gleichzeitig Verbindungsglied hin zum episodischen Langzeitgedächtnis (BADDELEY und WILSON, 2002).

Das Arbeits- bzw. das Kurzzeitgedächtnis speichert aktuelle, im Fokus der Aufmerksamkeit stehende Informationen temporär ab und hat dabei eine auf 6-30 Sekunden begrenzte Kapazität, je nach Komplexität der Aufgabenstellung. Bei Überschreitung dieser begrenzten Kapazität findet ein Übergang der betroffenen Informationsinhalte an das Langzeitgedächtnis statt (JENESON und SQUIRE, 2012).

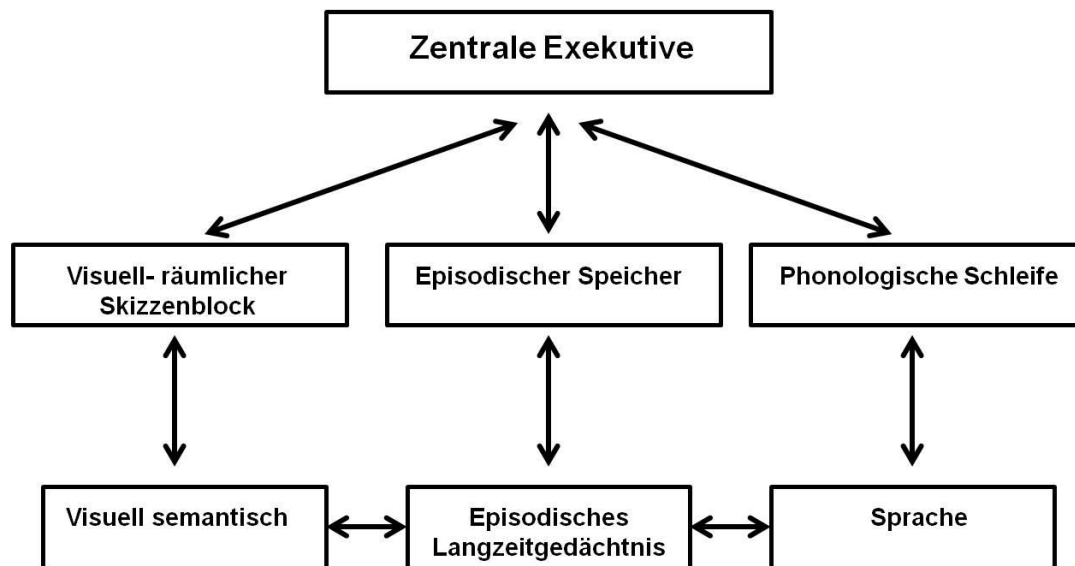


Abb. 01: Schematische Darstellung des Multikomponentenmodells des Kurz- bzw. Arbeitsgedächtnisses (modifiziert nach BADDELEY, 2000).

2.1.3 Langzeitgedächtnis

Das Langzeitgedächtnis ist schließlich der endgültige Speicherort für alle über das Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnis bewusst und unbewusst verarbeiteten Informationen.

Demnach kann man das Langzeitgedächtnis inhaltlich in zwei Bereiche untergliedern: das deklarative und das nicht-deklarative Gedächtnis (SQUIRE, 1992).

Diese beiden Unterbereiche des Langzeitgedächtnisses lassen sich nach CALABRESE und MARKOWITSCH in mehrere Systeme untergliedern:

Das **episodische Gedächtnis**, welches bestimmte Ereignisse speichert, das **semantische System**, das als Speicherort für Tatsachenwissen dient, das **prozedurale Gedächtnis** für Fertigkeiten und Abläufe, die sog. „**Priming Form**“, auch als Prägung bezeichnet, sowie das **perzeptuelle Gedächtnis**, welches die operante Konditionierung und das nicht-assoziative Lernen (Habituation/ Sensitivierung) beinhaltet (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003). Als Habituation (von lat. „habituari“: „etwas an sich haben“, „sich gewöhnen“) bezeichnet man im Allgemeinen die Abschwächung einer Reaktion auf einen spezifischen, sich wiederholenden und für unbedeutend erachteten Reiz.

Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff Sensitivierung (von lat. „sensificare“: „empfindsam machen“) die Zunahme einer Reaktion auf einen unspezifischen, immer wiederkehrenden Reiz. Das Experiment von DAVIS an Ratten zeigt, dass der generelle Erregungszustand der

Tiere einen Einfluss darauf hat, ob eine Habituation oder eine Sensitivierung eintritt. Bei einem niedrigen Grunderregungszustand führen Reize eher zu einer Habituation. Ist das Erregungslevel bereits grundsätzlich erhöht, steigert dies die Bereitschaft des Organismus auf Reize verstärkt zu reagieren und es tritt eine Sensitivierung ein (DAVIS, 1974).

2.1.3.1 Deklaratives Gedächtnis:

Im deklarativen (bewussten) Gedächtnis findet die bewusste Wahrnehmung von Ereignissen und Tatsachen statt (ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1993). Es umfasst die Subsysteme des **episodischen** (Ereignisse) und **semantischen Gedächtnisses** (Wissen und Fakten) (SQUIRE und ZOLA, 1998; TULVING und MARKOWITSCH, 1998; CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).

Anatomisch kann man das deklarative Gedächtnis den Strukturen des medialen Temporallappens, des Hippokampus und dessen angrenzenden kortikalen Bereichen zuordnen (CLARK und SQUIRE, 2010). Diese sind wichtig für Lern- und Gedächtnisprozesse. Die langfristige Speicherung erfolgt jedoch im Neokortex (KESNER et al., 1987; ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1990; SQUIRE, 2009).

2.1.3.2 Nicht- deklaratives Gedächtnis:

Das nicht- deklarative (unbewusste) Gedächtnis umfasst alle nicht bewusst wahrgenommenen Lernprozesse. Es kann ebenfalls in mehrere Untersysteme gegliedert werden.

Im **prozeduralen Gedächtnis** werden dabei unbewusste motorische Fähigkeiten und Kenntnisse gespeichert, die man typischerweise ohne bewusste Erinnerung erwirbt, z. B. Laufen lernen (SQUIRE, 1992).

„**Priming Form**“ oder **Prägung** beschreibt die Fähigkeit, Schlüsselreize wiederzuerkennen, denen man in einem speziellen sensiblen Lebensabschnitt, der „Prägungsphase“ bereits unbewusst begegnet ist (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003; SQUIRE, 2009). Sie ist sehr begrenzt und irreversibel, sodass durch bestimmte Reize nur bestimmte Reaktionen ausgelöst werden, z. B. die Prägung bei Gänseküken, die nach dem Schlüpfen das nächstbeste, sich bewegende und regelmäßig Laut gebende Objekt als Mutter anerkennen (LORENZ, 1935).

Das **perzeptuelle Gedächtnis** schließlich umfasst die Teilbereiche nicht- assoziatives Lernen (Habituation und Sensitivierung) und operante Konditionierung, bei der ein ursprünglich

spontanes Verhalten durch Belohnung oder Bestrafung bestärkt oder verhindert wird, z. B. bekommt eine Ratte nur dann Futter, wenn sie einen bestimmten Hebel betätigt. Zunächst wird dies eher zufällig geschehen, mit jedem positiven Erfolg aber wird sie ihr Verhalten zielgerichteter ausführen (SKINNER, 1930).

Das nicht- deklarative Gedächtnis lässt sich folglich auch nicht auf bestimmte anatomische Strukturen des Gehirns begrenzen, sondern ist von verschiedenen Strukturen beeinflusst, jedoch unabhängig vom medialen Temporallappen (JENESON und SQUIRE, 2012).

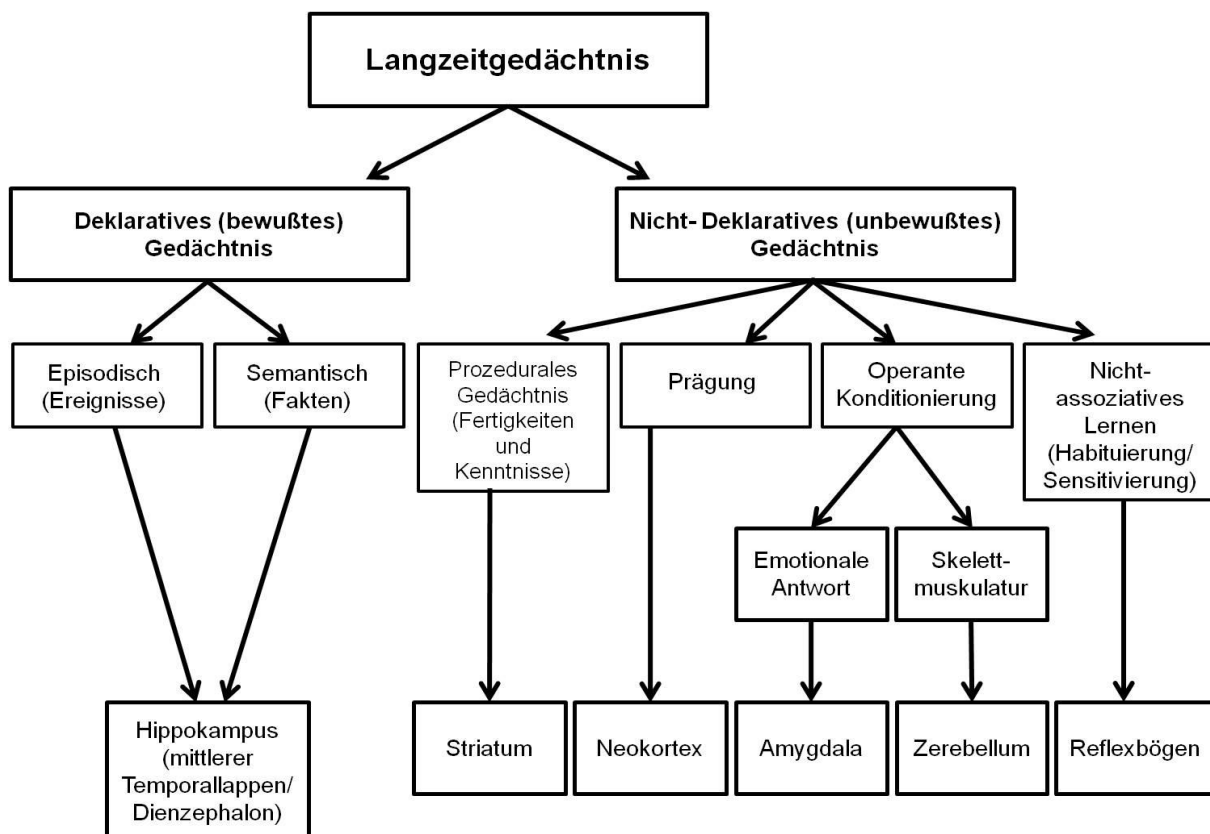


Abb. 02: Schematische Darstellung des Langzeitgedächtnisses mit zugeordneten anatomischen Strukturen (modifiziert nach SQUIRE, 2004).

2.2 Biologische Vergleichbarkeit von Nagetiermodell und Mensch

Eine wichtige Frage, die sich neben ethischen Überlegungen bei jedem Tierversuch stellt ist die, in wieweit sich tierexperimentell gewonnene Erkenntnisse, z.B. aus Studien, die sich mit der Erforschung der kognitiven Funktion befassen, auf den Menschen übertragen lassen. STECKLER und MUIR haben dazu in ihrer Arbeit grundlegende Gemeinsamkeiten und Unterschiede, sowie Lösungsansätze zu deren Überwindung aufgezeigt (STECKLER und MUIR, 1996).

Demnach müssen zunächst die verschiedenen psychologischen Prozesse zur Aufgabenstellung identifiziert werden. Danach muss sichergestellt werden, dass beide Spezies in der Lage sind analoge Muster erfüllen zu können. Schließlich muss gewährleistet sein, dass die Manipulationen vergleichbare Verhaltensänderungen verursachen, um Beweise für analoge Prozesse zu liefern.

Um jedoch die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, müssen oftmals einige Variablen an die jeweilige Spezies angepasst werden. So kann es nötig sein, die Komplexität einer Aufgabenstellung zu modifizieren, indem man Dauer und/oder Frequenz der Reizeinwirkung bzw. die Anzahl der Wahlmöglichkeiten verändert.

Beim Menschen wird die Funktion des Kurzzeitgedächtnisses häufig anhand eines Tests beurteilt, bei dem Begriffe erlernt und wieder abgerufen werden müssen. Dabei erzielen die Probanden bei den ersten und letztgenannten Begriffen deutlich bessere Leistungen. Dieses Phänomen wird als sog. „Primacy- und Recency- Effekt“ bezeichnet. Bei Ratten kann man ein ähnliches Phänomen im sog. „Radial- Eight- Arm- Maze“- Test feststellen. Dabei werden die Tiere, nachdem sie eine Futterbelohnung in einem der acht Arme gefunden hatten für eine bestimmte Zeit aus der Versuchsanordnung genommen. Im Wiederholungstest konnte dann beobachtet werden, dass die Versuchstiere nach dem Wiedereinsetzen in die Versuchsanordnung den zuletzt mit Futterbelohnung bestückten, korrekt besuchten Arm bevorzugten (KESNER, 1985).

ROTHBLAT et al. konnten zudem in einer Studie aufzeigen, dass Ratten in der Lage sind, Objekte in einem räumlichen Testumfeld zu erfassen und später wieder zu erkennen (ROTHBLAT et al., 1993).

Auch Motivation und Erregungszustand spielen eine große Rolle im Hinblick auf vergleichende Untersuchungen, da Stress die kognitive Leistung beeinflusst. MCEWEN und SAPOLSKY zeigten in ihrer Studie, dass zunächst eine stress- induzierte, sehr schnelle Katecholaminfreisetzung emotionale Gedächtnisverluste in der Amygdala verursacht. Eine

länger dauernde Stresssituation, vermittelt durch Glukokortikoide, führt zu einer kognitiven Abschwächung des deklarativen Gedächtnisses durch den irreversiblen Verlust von Neuronen vor allem im Hippokampus (MCEWEN und SAPOLSKY, 1995).

Da Tiere nicht die Möglichkeit der verbalen Kommunikation nutzen können, besteht die Aufgabe im Interspezies-spezifischen Vergleich darin, den Einfluss dieser Kommunikationsform so weit wie möglich zu reduzieren, indem man z.B. Aufgaben mit abstrakten Reizen gestaltet, die zudem schwer zu verbalisieren sind (STECKLER und MUIR, 1996). Gute Möglichkeiten bieten dazu sog. „simultaneous- oder delayed- matching- to- sample“ Tests, bei denen Beispiel- und Zielreiz mit Hilfe von Bildern, Geräuschen, visuellen Reizen oder abstrakten Gegenständen (räumliche Kognition) entweder gleichzeitig („simultaneous“) oder zeitlich verzögert („delayed“) dargeboten werden und wiedererkannt werden müssen (SAHAKIAN et al., 1988).

Der Tierversuch bietet die Möglichkeit, ganz gezielt in weitgehend homogenen Gruppen bestimmte Hypothesen reproduzierbar zu untersuchen. Denn im Gegensatz zu tierexperimentellen Studien ist das in der Klinik zur Verfügung stehende Patientengut extrem variabel was Alter, Geschlecht, soziale Herkunft, Bildung usw. anbelangt, was die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten erschwert.

2.2.1 Testsysteme zur Untersuchung der Neurokognition

Zur Untersuchung der räumlich verknüpften kognitiven und motorischen Funktionen sowie des Verhaltens finden sog. „**Open Field**“- Systeme Verwendung. Sie machen sich natürliche Verhaltensweisen, wie Flucht- und Angstverhalten der Versuchstiere zunutze, um Veränderungen in der Kognition zu untersuchen.

2.2.1.1 „Open Field“- Test

Zur Untersuchung des Angstverhaltens wurde erstmals 1934 von HALL der sog. „**Open-Field**“- Test beschrieben. In einer zirkulären Arena mit 1,2 m Durchmesser und 0,45 m hohen Seitenwänden wird das Zentrum (das „offene Feld“) hell erleuchtet. Das im dunkleren Randbereich eingesetzte Tier wird über einen bestimmten Zeitraum beobachtet. Tiere mit einem ausgeprägten Angstverhalten bleiben vermehrt im Randbereich („Thigmotaxis“), meiden die helle zentrale Fläche („Agoraphobie“) und setzen vermehrt Kot ab (HALL, 1934). Dieses Angstverhalten wird durch die Faktoren der Separation von den Artgenossen und das Einsetzen in eine relativ weiträumige, ungeschützte Umgebung ausgelöst (PRUT und BELZUNG, 2003).

Im Laufe der Zeit wurde dieses ursprüngliche Modell mehrfach modifiziert. Variiert wurde dabei die Form (rund, rechteckig, quadratisch), die Beobachtungsdauer (von zwei Minuten bis zu mehreren Stunden (GOLANI, 1999), der Ort des Einsetzens der Ratte (peripher oder zentral), die Beleuchtung (schwach bis hell erleuchtet oder unter Rotlicht) oder die Bereicherung der Testarena mit Objekten und Futter (PRUT und BELZUNG, 2003).

Im Allgemeinen lassen sich durch den „Open-Field“- Test relevante Erkenntnisse zu angstbezogenem Verhalten (Thigmotaxis, vermehrter Kotabsatz und gesteigerte Putzfrequenz), lokomotorischer Aktivität (horizontale Lokomotion) und allgemeiner Exploration (Aufrichten auf die Hinterbeine) gewinnen (CRABBE, 1986; CLEMENT et al., 1997; PRUT und BELZUNG, 2003).

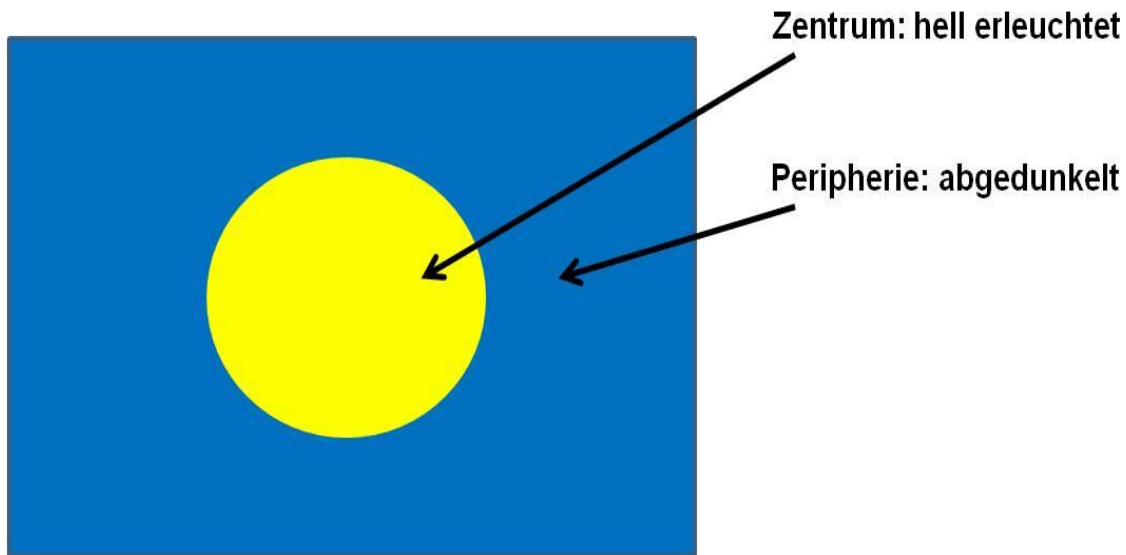


Abb. 03: Schematische Darstellung (exemplarisch) einer Open- Field- Testanordnung; mit zentral gelegener, hell erleuchteter Fläche und dem peripheren, abgedunkelten Bereich (modifiziert nach HALL, 1934).

2.2.1.2 „Morris- Water- Maze“- Test

MORRIS entwickelte darauf aufbauend den sog. „**Morris- Water- Maze**“-Test (MORRIS, 1984).

In einem mit 26 °C warmem Wasser gefüllten, zirkulären Becken von 2,14 m Durchmesser und 0,4 m Höhe befindet sich einen Zentimeter unterhalb der Wasseroberfläche eine 9 cm große und immer an derselben Stelle lokalisierte, durchsichtige Plattform. Außerhalb der Versuchsanordnung dienen willkürlich angebrachte, immer gleichbleibende Wandmarkierungen im Raum dem Tier zur Orientierung. Zusätzlich wird das Becken in vier Quadranten aufgeteilt.

In diesem Test macht man sich das natürliche Fluchtverhalten der Ratte zunutze. Die Aufgabe besteht darin, nach dem Einsetzen schwimmend und sich an den Wandmarkierungen orientierend die Plattform zu erreichen. Thigmotaxis (der Aufenthalt im äußeren, geschützten Bereich entlang der Beckenwand) und die Schwimmgeschwindigkeit lassen Rückschlüsse auf Angst und Motivation zu (MORRIS, 1984). Die ermittelte Versuchsdauer und zurückgelegte Schwimmstrecke ermöglichen Aussagen zu Funktionen des Arbeitsgedächtnisses, sowie des visuell- räumlichen Gedächtnisses (HODGES, 1996).

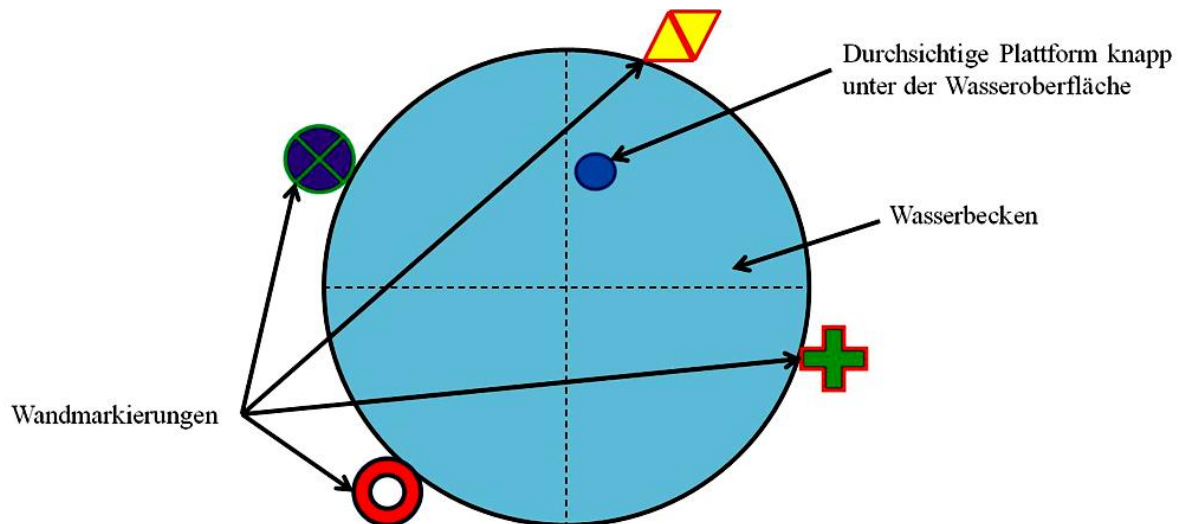


Abb. 04: Schematische Aufsicht auf die Morris- Water- Maze- Testanordnung; mit Wasserbecken, Plattform und Wandmarkierungen, sowie den gestrichelten Quadrantenlinien (modifiziert nach MORRIS, 1984).

2.2.1.3 „Hole- Board“- Test

Der **klassische „Hole- Board“-** Test, 1962 von BOISSIER und SIMON entwickelt, wurde primär zur quantitativen Auswertung des Neugierverhaltens bei Mäusen konzipiert und in der Folge erweitert, um zusätzlich die Motilität zu erfassen (BOISSIER et al., 1964; FILE und WARDILL, 1975; WEISCHER, 1976). Das System besteht aus einer Lochplatte, deren Löcher mit Futterbelohnung gefüllt, jedoch mit beweglichen Deckelchen abgedeckt sind, welche die Versuchstiere öffnen müssen, um an die Belohnung zu kommen. 1973 wurde das System an die Ratte adaptiert (FILE, 1973; FILE und POPE, 1974).

Eine Weiterentwicklung stellt der sog. **„modifizierte Hole- Board“-** Test dar, welcher den „Open-Field“- Test und den „klassischen Hole- Board“- Test in einem einzigen Testsystem vereint. So wird es ermöglicht, verschiedene Parameter, wie kognitive Fähigkeiten, Angstverhalten, Risikobewertung, allgemeine Erregung, Explorationsverhalten, lokomotorische Aktivität und soziale Affinität in einem einzigen Test zu erfassen (OHL et al., 2001 (a); OHL et al., 2001 (b)).

Ursprünglich wurde dieser Test entwickelt, um Effekte von psychosozialen Stress auf unkonditioniertes Verhalten und kognitive Funktionen bei Tupaia (asiatische Spitzhörnchen, *Tupaia belangeri*) zu erforschen (OHL et al., 1998). Um irritierende oder stressbehaftete Einflüsse zu vermeiden, wurde der Testbereich in den sog. „Homecage“ integriert. Dies bedeutet, dass die Versuchstiere in der Testarena von ihren Artgenossen im Haltungsabteil nur durch eine transparente, mit Löchern versehene Wand getrennt waren. 2001 wurde der Test

dann an die Ratte adaptiert (OHL et al., 2001 (b)).

Der modifizierte Hole- Board- Test besteht aus einer Testarena, die nur durch eine gelochte Plexiglasscheibe vom Wohnbereich der Tiere getrennt ist. Die eigentliche Testarena besteht aus einem „Open Field“, in dessen Mitte das sog. „Hole- Board“ liegt. Auf dem „Hole- Board“ befinden sich -je nach Testvariante- Zylinder oder Federdeckel aufgesteckt, welche die Löcher verschließen. Das Versuchstier soll nun gezielt die markierten, mit einer Futterbelohnung gefüllten Löcher aufsuchen und die Belohnung fressen. Mit Hilfe dieses Tests können komplexe Aussagen zu räumlichen oder visuell- räumlichen Funktionen getroffen werden (OHL et al., 1998).

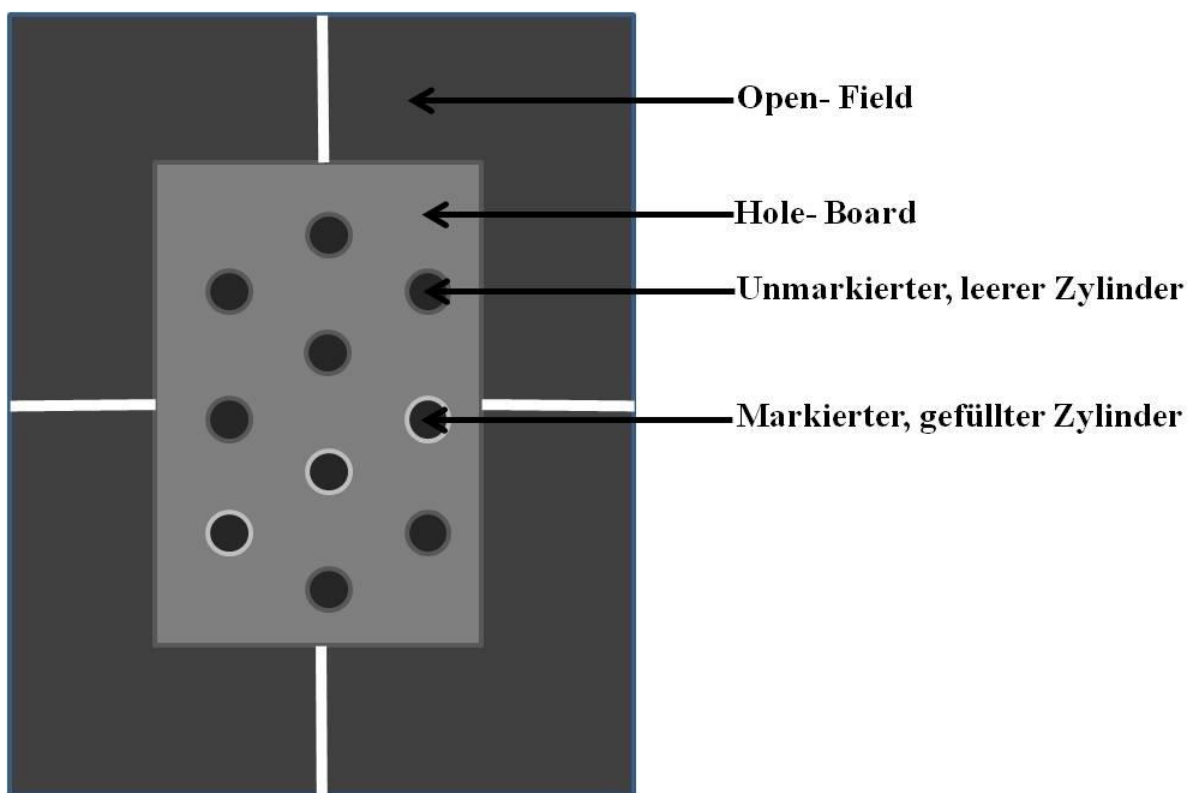


Abb. 05: Schematische Darstellung zum Aufbau des modifizierten Zylinder Hole Board Tests; mit markierten und gefüllten (hell umrandet), sowie nicht markierten und ungefüllten Zylindern. Aus der Aufsicht wird die Kombination aus Open- Field (dunkler, peripherer Bereich, durch weiße Linien in Quadranten unterteilt) und Hole- Board- Test (hellere, zentrale Fläche) ersichtlich (modifiziert nach OHL et al., 2003).

2.3 Zur extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand

2.3.1 Anwendung

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) ist ein Verfahren, das hauptsächlich im herzchirurgischen Bereich Anwendung findet, wenn es darum geht ein möglichst blutleeres und, in Kombination mit dem tief- hypothermen Kreislaufstillstand (deep- hypothermic circulatory arrest, DHCA) ein bewegungsarmes Operationsfeld zu schaffen (OATES et al., 1995).

Eine Herz- Lungen Maschine ermöglicht die teilweise oder vollständige Umleitung des Blutkreislaufes während der chirurgischen Versorgung von z.B. Ventrikel- bzw. Atriumseptumdefekten, angeborenen Herzfehlern und Aneurysmen, um das Operationsgebiet bewegungsarm, gleichzeitig aber die Versorgung des übrigen Organismus mit Hilfe der EKZ aufrecht zu erhalten.

Dieses Verfahren wurde zu Beginn der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts von DENNIS et al. und GIBBON entwickelt und erstmals am 6. Mai 1953 von GIBBON bei der Korrektur eines kongenitalen interatriellen Septumdefektes erfolgreich am Menschen durchgeführt (DENNIS et al., 1951; GIBBON, 1954; KIRKLIN et al., 1956).

Ein weiteres Einsatzgebiet stellt die chirurgische Versorgung von größeren Gefäßen, insbesondere größeren Arterien dar. Hierbei wird jedoch nur der betreffende Abschnitt abgeklemmt und durch einen sog. „arterioarteriellen Shunt“ ohne Pumpfunktion umgangen.

Die Blutversorgung und Oxygenierung des Gewebes erfolgt weiterhin durch die Pumpleistung des Herzens und die Gasaustauschfunktion der Lunge.

Um während des Eingriffs das Risiko von Schäden infolge einer Hypoperfusion mit folgender Hypoxie so gering wie möglich zu halten, wird zudem die therapeutische Hypothermie eingesetzt. Bereits in der Antike wurde die systematische Kühlung zu Therapiezwecken angewandt. Erste Berichte stammen aus der Zeit von 500 bis 400 Jahre vor Christus. Sie beschreiben Behandlungsversuche von Tetanusinfektionen der Anhänger des Hippokrates mit Ganzkörper- Kühlung (ADAMS, 1849). Fay, und vor allem Beck und Bailey trieben später die Anwendung der tiefen Hypothermie in der Herzchirurgie voran (ROTHOERL und BRAWANSKI, 2006).

Dem Verfahren der Hypothermie, dessen Wirkmechanismen bis heute als nicht genau verstanden gilt, liegt die Annahme zugrunde, dass die Hypothermie die zerebrale metabolische Rate von Sauerstoff (O_2) („cerebral metabolic rate for oxygen“, $CMRO_2$) im

Organismus signifikant senkt. Bereits bei 28 °C beträgt der Sauerstoffverbrauch nur mehr rund 40 bis 50 % des Verbrauchs bei normaler Körpertemperatur. Bei 18 °C liegt die $CMRO_2$ um 85 bis 90 % unter der $CMRO_2$ von 37 °C (GREELEY et al., 1991). Dieser Effekt erlaubt nun eine auf 50 - 60 min verlängerte Ischämie des Gehirns bei einer Kerntemperatur von 18 - 20 °C (COOK, 2001).

2.3.2 Pathophysiologische Gegebenheiten

Eine EKZ mit DHCA führt im Organismus zu verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen, die sehr häufig (mit der hohen Inzidenz von 60 % bis acht Tage nach dem Eingriff) postoperative kognitive Defizite zur Folge haben. Studien zu Koronararterien-Bypassoperationen zeigen, dass derartige Defizite bei 53 % der Patienten noch bei der Entlassung aus der Klinik vorliegen. Nach sechs Wochen sinkt die Inzidenz auf 36 %, nach sechs Monaten auf 24 % (NEWMAN et al., 2001).

Als ausschlaggebende schädigende Mechanismen gelten Hypoxie und Reperfusionsschäden (DU PLESSIS, 1997), sowie eine komplexe systemische inflammatorische Reaktion, die alle durch die Ischämie ausgelöst werden. Dabei scheinen der Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der EKZ (Schlauchsystem, Membranoxygenator), ein intraoperativ auftretender Blutverlust, das chirurgische Trauma selbst oder Transfusionen eine Rolle zu spielen (BUTLER et al., 1993).

Das Immunsystem des betroffenen Organismus reagiert auf eine EKZ über:

1. eine direkte Kontaktaktivierung nach Interaktion des zirkulierenden Blutes mit den Fremdoberflächen im EKZ- Kreislauf.
2. eine indirekte Aktivierung des Immunsystems durch Ischämie- Reperfusionsschäden in allen Organen.
3. eine indirekte Aktivierung der inflammatorischen Kaskade durch Endotoxämie (LAFHEY et al., 2002; GAO et al., 2005).

Neben den Ischämie- / Reperfusionsschäden können zusätzlich während einer EKZ mehrere zehntausend Emboli entstehen. Zum einen treten diese Emboli auf in Form von Luftbläschen im System, zum anderen können Gewebspartikel (Fett, Knochen, Muskulatur) aus dem Operationsgebiet in den Blutkreislauf abgeschwemmt werden. Die derart entstehenden Emboli werden als exogene Emboli bezeichnet. Endogen entstehen Emboli durch die Interaktion des Blutes mit der fremden Oberfläche des Schlauchsystems und des Oxygenators, die zu einer Aktivierung der Blutgerinnungskaskade führt. Zudem kann es durch Ablösung atheromatösen Materials zur Embolisierung kommen. Darüber hinaus lassen sich diese Emboli ihrer Größe nach in Makro- und Mikroemboli (ARROWSMITH et al., 2000), sowie strukturell in gasförmig und korpuskulär (GROCOTT et al., 2005) einteilen. Die Schädigung durch diese Art von Mikroembolien erfolgt auf zweierlei Weise. Einerseits können kleine Luftblasen die sehr englumigen Arteriolen verschließen und damit im betroffenen Gewebe direkt zu einer Ischämie führen. Andererseits können diese Luftblasen direkt Thrombozyten,

Leukozyten und die Komplementkaskade aktivieren, was zu einer zusätzlichen lokalen Schädigung des Gewebes und einer Verschlimmerung des ischämischen Insults führt (BORGER et al., 2001).

Korpuskuläre Emboli können entweder aus biologischen Partikeln, wie Blutzellaggregaten, denaturiertem Protein oder Fibrin, Fett, Haaren, Herzklappendebris oder Muskelfragmenten bestehen, oder anorganischer Genese sein (Polyvinylchlorid, Silikon, Wattefasern oder Staub) (ARROWSMITH et al., 2000). Die Zusammensetzung der zerebralen Mikroembolien ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch sind sie größtenteils gasförmigen Ursprungs.

Zusätzlich korreliert die Anzahl zerebraler Embolien mit atheromatösen Ablagerungen im aufsteigenden Ast der Aorta und im Aortenbogen (MACKENSEN et al., 2003). ROACH et al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit mäßiger bis schwerwiegender Atherosklerose der proximalen Aorta das Risiko während EKZ eine zerebrale Ischämie zu erleiden auf das etwa Vierfache im Vergleich zu unbelasteten Patienten ansteigt (ROACH et al., 1996).

Die Hypothermie beeinflusst durch die zunehmende Viskosität des zirkulierenden Blutes zudem auch dessen rheologische Eigenschaften. Um die Fließeigenschaften des Blutes während der hypothermen EKZ zu verbessern wird häufig eine Hämodilution durchgeführt, wobei meist ein Hämatokrit von 20 bis 25 % angestrebt wird. Dadurch erhöht sich der zerebrale Blutfluss ohne dabei die metabolische Sauerstoffrate im Gehirn zu beeinflussen (DU PLESSIS, 1997).

2.4 Geschlechtsunterschiede in der Erfolgsrate herzchirurgischer Maßnahmen

Bezüglich des Erfolges herzchirurgischer Maßnahmen sind spezifische Unterschiede zwischen Männern und Frauen ein häufig beschriebenes Phänomen. Insbesondere Frauen scheinen demnach eine höhere Morbidität und Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen zu haben (GORODESKI, 2002). In Bezug auf die dafür verantwortlichen pathophysiologischen Vorgänge wurden einige Risikofaktoren diskutiert: Frauen werden häufig später mit koronarerteriellen Erkrankungen vorstellig als Männer und haben zudem häufiger Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Atherosklerose (EDWARDS et al., 1998; VACCARINO et al., 2002). Zusätzlich haben Frauen eine geringere Körperoberfläche und ein geringeres Blutvolumen als Männer, benötigen also in der Folge auch mehr Bluttransfusionen während des Eingriffes (RANUCCI et al., 2008). Unabhängig jedoch von diesen oben genannten Risikofaktoren, ist das weibliche Geschlecht einem höheren Risiko für postoperative Komplikationen ausgesetzt. So ist die postoperative Morbidität erhöht. Frauen erleiden postoperativ häufiger Schlaganfälle und Herzinfarkte. Sie haben überdies generell eine verminderte Lebensqualität nach aortokoronaren Bypass-Eingriffen (GURU et al., 2006; ALAM et al., 2012). So scheinen sie v.a. nach der Menopause anfälliger für Erkrankungen der Herzgefäße (ROOF und HALL, 2000; CARWILE et al., 2009) und neurodegenerative Erkrankungen (MERCHENTHALER et al., 2003; KIPP und BEYER, 2009) zu sein als prämenopausale Frauen. Als zugrundeliegende Ursachen für diese geschlechtsspezifischen Unterschiede werden sowohl genetische als auch hormonelle Faktoren diskutiert (KIPP et al., 2006; HERSON et al., 2009; ACS et al., 2009). Zusätzlich zu diesen Unterschieden in der kardialen Funktion wurden auch Unterschiede in der neuronalen Funktion zwischen Männern und Frauen beschrieben (GURU et al., 2006). Letzteres ist erwartbar, da die Geschlechtshormone Progesteron und Testosteron auch als Neurosteroid agieren, indem sie beispielsweise die Nervenzellinteraktion durch intrazelluläre Rezeptorbindungen kontrollieren und die Gentranskription modulieren (MELCANGI und MENSAH-NYAGAN, 2008; ZHENG, 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass 17 β -Östradiol im Hippokampus Einfluss auf Feinmotorik, Gemütslage, Erinnerung und auf die Kognition haben kann (WOOLLEY et al., 1990; POZZI et al., 2006).

2.4.1 Physiologie der Geschlechtshormone

Die Sexualhormone Östrogen, Progesteron und Testosteron lassen sich chemisch auf das Cholesterol als Ausgangsmolekül zurückführen und zählen somit zu den lipidlöslichen Steroidhormonen. Alle Sexualhormone kommen bei männlichen und weiblichen Individuen vor, den Geschlechtsunterschied bestimmen lediglich die Hormonkonzentration im Blut und das Verhältnis der Hormone zueinander.

Weibliche Sexualhormone sind Östrogene und Gestagene, männlichen Sexualhormone werden als Androgene bezeichnet.

Die Regulierung der Ausschüttung der Geschlechtshormone erfolgt bei beiden Geschlechtern analog und vor allem über komplexe Rückkoppelungssysteme. Zentrales Organ ist der Hypothalamus, welcher durch die Sekretion von Gonadoliberin, einem Dekapeptid, die Hypophyse anregt, die Gonadotropine Lutropin, auch bezeichnet als luteinisierendes Hormon (LH) und Follitropin, auch bezeichnet als Follikel- stimulierendes Hormon (FSH) zu sezernieren. Gonadoliberin wirkt auf den Hypophysenvorderlappen und führt dort zur Freisetzung der Gonadotropine. Benannt sind diese, ihrer Struktur nach den Glykoproteinen zuzuordnenden Hormone, nach ihrer Wirkung im weiblichen Organismus. Gonadoliberin und in der Folge auch die Gonadotropine FSH und LH werden speziesabhängig pulsatil in Abständen von 30 min (Ratte/ Maus) bis 120 min (Mensch) bei weiblichen, und einigen Stunden bei männlichen Organismen sezerniert. Die Ursache für diese pulsatile Sekretion ist bisher unbekannt (CONSTANTIN, 2011). FSH wirkt vor allem im Ovar auf die Follikelreifung. LH nimmt Einfluss auf die Bildung des Gelbkörpers (Corpus luteum, lat. „luteus“, „goldgelb“). Sie fördern in den weiblichen Keimdrüsen die Bildung von Östrogenen und Gestagenen und nehmen somit Einfluss auf den weiblichen Zyklus.

Sie führen im männlichen Organismus in den Leydig- Zellen des Hodens zur vermehrten Produktion von Testosteron. Dieses bewirkt durch eine direkte negative Rückkopplung auf den Hypothalamus die Verminderung der Gonadoliberinfreisetzung. Testosteron fördert jedoch ebenso die Synthese von Inhibin in den Sertoli-Zellen der Hodenkanälchen. Dieses bewirkt nun durch eine negative Rückkopplung auf die Hypophyse eine verminderte Freisetzung von FSH aus dem Hypophysenvorderlappen.

Im weiblichen Organismus ist die Regulierung komplexer, da die Hormonproduktion zyklisch abläuft. Zunächst ist wieder der Hypothalamus durch die Freisetzung von Gonadoliberin das zentrale Organ. Auch hier wirkt es verstärkend auf die Hypophyse und die Freisetzung der Gonadotropine LH und FSH. Nun wirkt zunächst das FSH stimulierend auf die

Follikelbildung ein. Die sog. „Theka- Zellen“ aus dem Follikelrand produzieren vermehrt Östrogen. Dieses wirkt zunächst hemmend auf die Gonadotropinausschüttung aus der Hypophyse ein. Ein Anstieg über einen kritischen Punkt hinaus jedoch stimuliert, durch einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus, kurzzeitig den Hypothalamus zu einer sehr starken Sekretion von Gonadoliberin. Dieser Sekretionsschub hat demnach auch eine vermehrte Ausschüttung von LH und FSH zur Folge. Man bezeichnet ihn auch als LH-Gipfel. Etwa 24 Stunden danach kommt es zum Eisprung (siehe Abb. 06, strichlierter Pfad).

Der gesprungene Follikel entwickelt sich unter dem Einfluss von LH weiter zum Gelbkörper, dessen Zellen nun vermehrt Progesteron sezernieren. Dieses wirkt in negativer Rückkoppelung hemmend auf die Sekretion der Gonadotropine aus der Hypophyse (siehe Abb. 06, durchgezogener Pfad).

Der Transport der Östro- und Androgene im Blut erfolgt zu ungefähr 98 % gebunden an das sog. „Testosteron- Östrogen- bindende (Transport-) Protein“, nur ca. 2 % kommen frei vor und können somit ihre biologische Aktivität unmittelbar entfalten. Progesteron wird überwiegend an Transkortin gebunden transportiert.

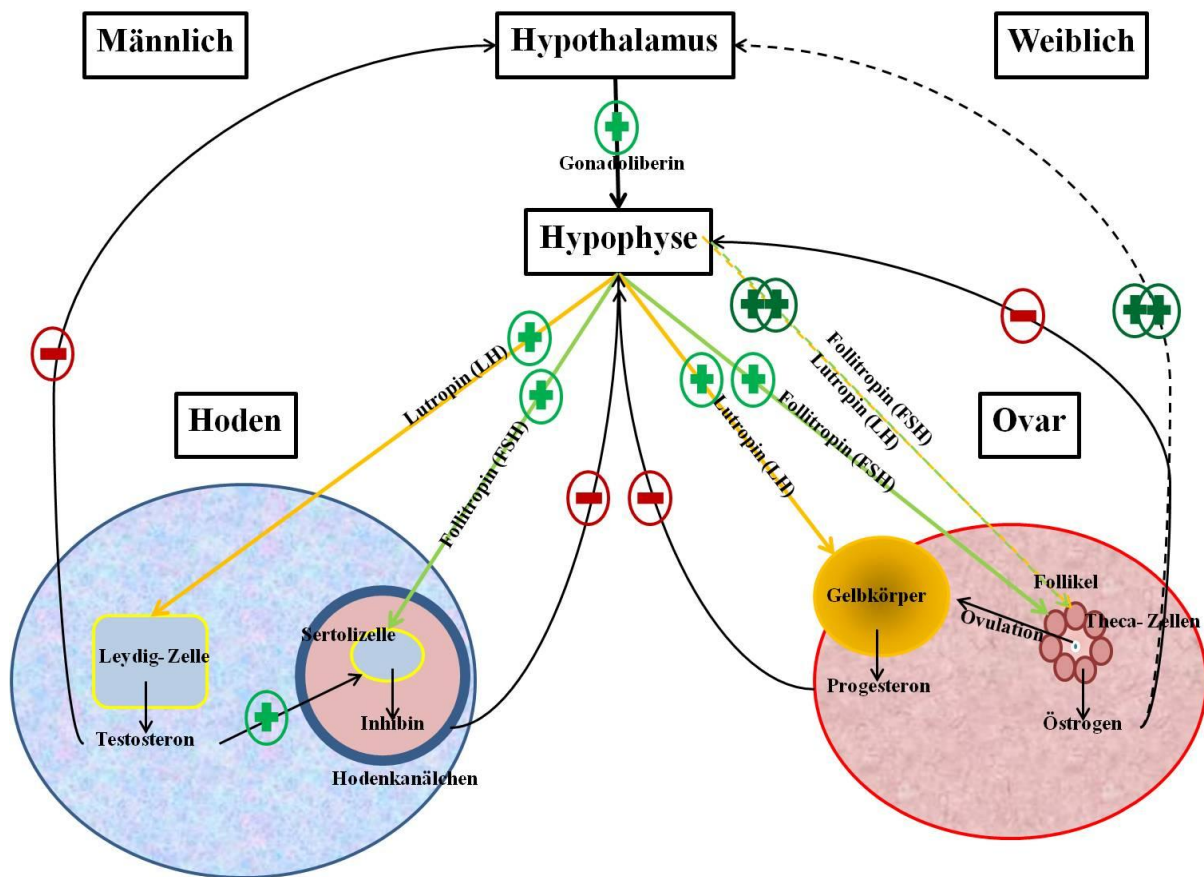


Abb. 06: Schematische Darstellung der Regulation der Ausschüttung der Geschlechtshormone (modifiziert nach HORN, 2003).

2.4.1.1 Östrogene

Der Begriff Östrogen ist aus dem lateinischen „oestrus“ für Brunst und „generare“ für „hervorbringen“, „erzeugen“ hergeleitet. Das wichtigste Östrogen ist das 17 β - Östradiol. Daneben gibt es noch Östron und Östriol, die jedoch bereits Abbauprodukte darstellen und entsprechend eine geringere Wirksamkeit aufweisen.

Ihre Wirkung erzielen Östrogene auf zweierlei Weise:

Zunächst fördern Östrogene die Entwicklung der weiblichen Sexualorgane wie Vagina und Uterus und während der Pubertät die Entwicklung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. In der ersten Hälfte des Menstruationszyklus stimuliert Östradiol zudem die Proliferation der Uterusschleimhaut.

Darüber hinaus beeinflussen Östrogene unter anderem das Knochenwachstum. Sie bewirken eine stärkere Kalziumeinlagerung in die Knochen und einen schnelleren Epiphysenfugenschluss und begrenzen somit das Längenwachstum. Zusätzlich beeinflussen sie auch den Wasser- und Elektrolythaushalt: sie führen zu einer Retention von Na⁺ und H₂O im Extrazellulärraum, was zu Gewichtszunahme führen kann. Zudem beeinflussen Östrogene die Synthese von Gerinnungsfaktoren (FOLSOM et al., 1991; LEE et al., 1993; HULLEY et al., 1998).

Neben den genannten Wirkungen zeigen verschiedene *in vitro* und *in vivo*- Studien, dass Östrogene auch eine neuroprotektive Wirkung entfalten. Für diese Wirkung werden unterschiedliche Mechanismen vermutet:

Zunächst scheinen dabei Östrogenrezeptoren („estrogen receptors“, ER), vor allem die beiden Isoformen ER α und ER β eine bedeutende Rolle zu spielen. Sie werden beide auf kortikalen Astrozyten, Neuronen und Endothelzellen exprimiert. Eine Hochregulierung dieser Rezeptoren beeinflusst die Expression von Genen, welche mit der Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. Bestätigt hat diese Vermutungen eine Studie von SAWADA et al., in der gezeigt werden konnte, dass der ER- Antagonist ICI182780 (Faslodex[®], Astra Zeneca, Cheshire, UK) bei intakten weiblichen Mäusen, nach Verschluss der mittleren Hirnarterie (middle cerebral artery occlusion, MCAO), einen dramatischen Anstieg der Infarktausdehnung bewirkt hatte (SAWADA et al., 2000). Die Studie von DUBAL et al. zeigt dabei, dass vor allem ER α an der Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung von Östrogenen beteiligt ist: Sowohl ER β - Knockout- als auch Östrogen- behandelte Wildtyp- Mäuse hatten ein signifikant besseres Outcome als die ER α - Knockout- Mäuse (DUBAL et al., 2001). Es scheint erwiesen, dass Östrogen, ähnlich wie die anderen Steroidhormone Kortisol,

Aldosteron, sowie Progesteron, Testosteron, als Transkriptionsfaktor im klassischen Sinne agieren kann. Östrogen bindet dabei an nukleäre Rezeptoren, die in den Kern translozieren und dort mit Östrogen- affinen Elementen im Promoter des Zielgens interagieren (LIU et al., 2010).

So reguliert Östrogen u. a. die B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) - mRNA- und Protein- Expression hoch, was nach einer MCAO zu reduzierten Infarktgrößen bei weiblich intakten und mit 17 β -Östradiol supplementierten Tieren führt (ALKAYED et al., 1998).

Des Weiteren reduziert Östrogen die Zellschädigung im Gehirn durch eine Steigerung der Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). PI3K ist durch ihren anti-inflammatorischen Effekt ein wichtiger Mediator neuroprotektiver Signalkaskaden (BRYANT et al., 2006). Dieser anti-inflammatorische Effekt ist bedingt durch die Hemmung von Mikroglia-Zellen und der durch die induzierbare Stickoxid- Synthase („inducible nitric oxide synthase“, iNOS) vermittelten Immunantwort. Zusätzlich hemmt PI3K verschiedene pro-inflammatorische Mediatoren, wie Metalloproteinasen, Prostaglandin E2 und Zyklooxygenase-2 (COX-2) (VEGETO et al., 2008).

Überdies steigert Östrogen die endotheliale Stickoxid- Synthase („endothelial nitric oxide synthase“, eNOS) wodurch vermehrt Stickoxid aus L-Arginin freigesetzt wird. Die Folge davon ist eine Gefäßerweiterung und eine Blutflusserhöhung im ischämischen Gehirn (HAYASHI et al., 1995; STIRONE et al., 2005). Östrogene modulieren zudem antioxidativ wirksame Enzyme, wie die Superoxid Dismutase, Katalase und Glutathionperoxidase. So reduzieren sie oxidativen Stress, welcher u. a. infolge einer Ischämie besonders in Geweben mit hohem Energiebedarf wie dem Gehirn, schnell zu Nekrose und Apoptose führen kann (AZEVEDO et al., 2001). Darüber hinaus unterstützt Östrogen in geschädigten Gebieten die Neuroneogenese und Ansiedlung von neu gebildeten Neuronen aus dem Gyrus dentatus und der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels (SUZUKI et al., 2007). Auch die Angiogeneese durch Erhöhung der mRNA- und Proteinexpression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors („vascular endothelial growth factor“, VEGF) im frontalen Kortex nach Schädigung und des Angiopoietin-1 werden mit der Wirkung von Östrogenen in Zusammenhang gebracht (JESMIN et al., 2003; ARDELT et al., 2005).

Der letzte Schritt der Östrogensynthese erfolgt enzymatisch durch Aromatasen aus Androgenen. So wird aus Testosteron 17 β - Östradiol, aus Androstendion wird Östron und daraus wiederum Östriol synthetisiert. Letzteres stellt aber, wie beschrieben, bereits ein Abbauprodukt dar.

Der Ab- bzw. Umbau der Östrogene erfolgt wie bei allen Steroiden mittels Biotransformation

in der Leber. Durch Glukuronidierung bzw. Sulfatierung werden sie wasserlöslich und können über die Galle und über die Niere ausgeschieden werden. Eine Rückresorption aus dem Darm (enterohepatischer Kreislauf) ist möglich.

2.4.1.2 Progesteron

Progesteron ist auch bekannt als das sog. „Schwangerschaftshormon“ und ist der wichtigste Vertreter der Gestagene. Die Bezeichnung Gestagen geht auf den lateinischen Begriff „gestare“ für „tragen“ zurück. Gestagene sind wichtig für die Aufrechterhaltung einer Gravidität. Progesteron im Speziellen entfaltet seine Wirkung besonders in der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus. Es fördert dabei die Durchblutung des Uterus und bereitet ihn insgesamt auf eine Gravidität vor.

Auch Progesteron wird eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben. Progesteron wird innerhalb des Gehirns in die stärker neuro-aktiven Metaboliten 5 α - Dihydroprogesteron und 3 α ,5 α -Tetrahydroprogesteron (Allopregnanolon) umgewandelt. Für diese beiden Metaboliten des Progesterons konnte ein hemmender Einfluss nach einer globalen zerebralen Ischämie auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) und Stickoxid- Synthase-2 (NOS-2) gezeigt werden (AGGARWAL et al., 2008; GIBSON et al., 2005). Progesteron senkt zudem die Konzentration von Malondialdehyd, einem Marker für oxidativen Stress, und fördert die Expression antioxidativ wirksamer Enzyme wie Superoxid Dismutase, Glutathionperoxidase und Katalase (AGGARWAL et al., 2008; OZACMAK und SAYAN, 2009). Darüber hinaus beeinflusst Progesteron die Expression des sog. „Aquaporin-4“, einem integralen Membranprotein, das den Wasserhaushalt der Zellen steuert, und somit im Rahmen eines zerebralen Ödemgeschehens eine Rolle spielt (GUO et al., 2006).

Die Synthese von Progesteron erfolgt aus Cholesterolmolekülen, welche über Pregnenolon weiter zu Progesteron umgewandelt werden.

Der Abbau erfolgt analog zu den Östrogenen in der Leber und die Ausscheidung vorwiegend ebenfalls über die Nieren.

2.4.1.3 Testosteron

Bei den Androgenen stehen besonders Testosteron und dessen biologisch wirksameres Analogon Dihydrotestosteron im Vordergrund. Der Begriff Testosteron ist aus dem lateinischen „testes“ für „Hoden“ hergeleitet, da es hauptsächlich in den Leydig'schen Zellen der Hoden synthetisiert wird.

Androgene sorgen über die Stimulation der Sertoli- Zellen in den Tubuli seminiferi („Hodenkanälchen“) für die Aufrechterhaltung der Spermiogenese. Zusätzlich fördern sie während der Embryogenese und nach der Geburt die Entwicklung und Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane. Androgene führen darüber hinaus zur Ausbildung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale wie Bartwuchs, männliche Körperbehaarung, Vergrößerung des Kehlkopfes und Stimmbruch in der Pubertät. Sie besitzen überdies noch eine anabole Wirkung, was zu einer Zunahme der Muskelmasse führt.

Über die neuroprotektive Wirkung der Androgene ist bisher wenig bekannt. Im Tiermodell scheinen Androgene präoperativ die schädigende Wirkung einer Ischämie zu verstärken (HAWK et al., 1998; YANG et al., 2002; CHENG et al., 2007). Andererseits konnte für einen präischämisch niedrigen Testosteronwert mit postischämischer Substitution ein protektiver Effekt gezeigt werden (YANG et al., 2003; PAN et al., 2007). So vermutet man, dass Androgene bei einer akuten Schädigung einen negativ verstärkenden Einfluss nehmen, die postischämische Regeneration hingegen positiv verstärken (HERSON et al., 2009). Potentielle Mechanismen, die diesen Beobachtungen zugrunde liegen sind beispielsweise eine Androgen-vermittelte Normalisierung der Reperfusion, die Unterstützung der axonalen Regeneration und der Synapto- und Neurogenese sein (TANZER und JONES, 1997; CHEN et al., 2002).

Die Synthese der Androgene erfolgt ebenfalls aus Cholesterol, dem Grundbaustein aller Steroidhormone. Aus Cholesterol wird Pregnenolon synthetisiert, welches über zwei Wege zu Androstendion und schließlich durch die 17β -Dehydrogenase zu Testosteron umgewandelt wird. Das Testosteron kann dann von der 5α -Reduktase zu 5α -Dihydrotestosteron reduziert werden, welches im Vergleich zum Testosteron eine ca. dreifach höhere biologische Aktivität aufweist.

Der Ab- bzw. Umbau der Androgene erfolgt -wie bei allen Steroiden- in der Leber. Ausscheidungsfähig werden sie durch Glukuronidierung bzw. Sulfatierung. Danach werden sie vorwiegend über die Niere ausgeschieden (KREUTZIG, 2002; HORN, 2003).

2.4.2 Klinische Humanstudien

Der Einfluss von Geschlecht und Geschlechtshormonen wurde im humanmedizinischen Bereich in einer Vielzahl von klinischen Studien zu einer Vielzahl von Szenarien (Schlaganfall, Sepsis, Herzchirurgie, etc.) bereits untersucht. Die Mehrheit dieser Studien fokussiert auf den Unterschied zwischen männlich und gleichaltrig, postmenopausal weiblich (CHANG et al., 2002; WOODS et al., 2003; EMMERT et al., 2010; ALAM et al., 2012). Dabei haben alle in der Herzchirurgie durchgeführten Studien für Frauen ein signifikant höheres Risiko aufgezeigt, die perioperative Mortalität und Morbidität betreffend. Dieses höhere Risiko der Frauen bleibt bestehen, auch wenn man eventuelle Begleit- und Nebenerkrankungen, wie beispielsweise Bluthochdruck, Atherosklerose, Übergewicht und Diabetes mellitus mit berücksichtigt. Frauen haben eine geringere Körperoberfläche, daraus resultierend auch ein insgesamt niedrigeres Blutvolumen und einen niedrigeren durchschnittlichen Hämoglobinwert. Frauen müssen postoperativ länger beatmet werden und die postoperative Intensivbetreuung ist ebenfalls umfangreicher und länger. All diese geschlechtsspezifischen diagnostischen und therapeutischen Unterschiede vermögen aber die hohen Mortalitätsunterschiede nicht zu erklären. In vielen multivariaten Analysen bleibt das Geschlecht als signifikanter Risikofaktor, der in alle bedeutenden Bewertungssysteme zur Berechnung des präoperativen Risikos vor herzchirurgischen Eingriffen mit eingeht, bestehen. Über die Situation prämenopausaler Frauen gibt es bisher, aufgrund der geringen Fallzahlen, leider keine abgeschlossenen Studien. Beobachtungen aus dem klinischen Alltag zeigen aber, dass prämenopausale Frauen mit Herzerkrankungen aus bisher unerklärten Gründen eine beinahe doppelt so hohe Sterblichkeitsrate haben, wie gleichaltrige Männer (aktuell laufende Studie in den USA, Studien-Nr. NCT00572858).

Der Einfluss der Substitution von Sexualhormonen wird indes kontrovers diskutiert. Einerseits zeigen Studien einen positiven Effekt einer Hormonsupplementierung auf das postoperative Ergebnis (EMMELOT-VONK et al., 2008; NUSSMEIER et al., 2002), andererseits musste die sog. „Womens Health Initiative Study“ aufgrund eines erhöhten Schlaganfall- Risikos bei den Östrogen- / Progestin- supplementierten Versuchsgruppen abgebrochen werden (ROSSOUW et al., 2002). Ebenso konnte eine Studie zur kognitiven Leistungsfähigkeit keinen positiven Effekt von 17 β - Östradiol belegen (HOGUE et al., 2007).

2.4.3 Tierexperimentelle Studien

Ein Einfluss von Geschlechtshormonen auf eine Gehirnischämie konnte *in vitro* und *in vivo* in Schlaganfall-Modellen gezeigt werden. Tierexperimentell konnte dabei gezeigt werden, dass eine Östrogen-Gabe nach fokaler Ischämie die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor Kappa B (NFκB) reduziert (WEN et al., 2004). Dieser Transkriptionsfaktor steht im Entzündungsgeschehen an zentraler Position und reguliert zahlreiche Mediatoren wie z.B. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNFα) und Zyklooxygenase-2 (COX-2). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass eine reduzierte NFκB - Aktivierung z.B. eine Verringerung der Infarktgröße nach fokaler Ischämie bedingt (NURMI et al., 2004). 17β-Östradiol scheint somit bei fokalen Schäden einen positiven neuroprotektiven Einfluss zu haben (HURN et al., 2005).

Die genaue Bedeutung der Geschlechtshormone im Rahmen einer globalen Ischämie ist noch immer nicht bekannt. Tierexperimentelle Studien konnten in einem Rattenmodell mit vorübergehender globaler Ischämie keine neuroprotektive Wirkung des 17β-Östradiol nachweisen (HARUKUNI et al., 2001) und es gibt Studien, bei der die Gabe von 17β-Östradiol in einem Nager- Modell der MCAO negative Effekte auf die Neurone und Axone hatte (BINGHAM et al., 2005). In einem Ischämie- Reperfusionsmodell bei Mäusen führte eine Testosteron-Gabe sogar zu einer Verschlimmerung des neuronalen Schadens (NAKANO et al., 2010). Diese bisher uneinheitlichen Ergebnisse lassen geschlechtsspezifische Ursachen vermuten, die über die reine Wirkung der Geschlechtshormone hinausgehen.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielvorstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Geschlecht und Geschlechtshormonstatus auf neurologische und neurokognitive Funktionen sowie auf die Gehirnmorphologie 14 Tage nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit 45 minütigem tief hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) im Rattenmodell.

Das Modell der EKZ mit 45 min DHCA ist gekennzeichnet durch eine leichte zerebrale Schädigung bei gleichzeitiger Induktion deutlich nachweisbarer neurologischer und neurokognitiver Defizite und hat sich deshalb u.a. als geeignet erwiesen, postoperative kognitive Defizite und in Folge potentielle neuroprotektive Strategien präklinisch zu untersuchen. Von neurologischen und neurokognitiven Defiziten nach dieser Art des Vorgehens im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe sind Frauen deutlich stärker betroffen als Männer. Dieses erhöhte Morbiditäts- und sogar Mortalitätsrisiko besteht dabei unabhängig von zahlreichen Faktoren wie höheres Alter mit insgesamt mehr Begleiterkrankungen, geringerer Körpergröße oder kleineren Gefäßen.

Inwieweit dabei das Geschlecht und/oder die Geschlechtshormone dieses höhere Risiko der Frauen bei dieser Art Eingriff beeinflussen, ist bisher nicht geklärt. Ein Einfluß des Geschlechtshormons Östrogen wird vermutet, denn es zeigen sich Unterschiede in Morbidität und Mortalität zwischen prä- und postmenopausalen Frauen. Da sich die Zusammenhänge im klinischen Bereich nicht gezielt untersuchen lassen, bietet hier ein Tiermodell eine gute Möglichkeit. In der vorliegenden Studie soll nun deshalb die Situation postmenopausaler Frauen im Tierexperiment nachgestellt und vergleichend zur prämenopausalen Situation (nicht kastriert/kastriert) sowie zum männlichen Geschlecht mit und ohne physiologischem Geschlechtshormonstatus (nicht kastriert/kastriert) untersucht werden. Hauptzielgröße ist dabei die postoperative neurologische und kognitive Funktion im Geschlechter-/Hormonstatusvergleich. Nebenzielgröße ist das hirnmorphologische Ergebnis, das Einblick geben soll in mögliche neuroprotektive oder neurodegenerative Einflüsse von Steroidhormonen im Zusammenhang mit extrakorporaler Zirkulation und tief hypothermem Kreislaufstillstand.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchsplanung

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung vom 18. Mai 2006, BGBl. I S. 1206, 1313, zuletzt geändert am 21. Dezember 2006, BGBl. I S. 3294) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2.1.54-2531-20-10).

Durchgeführt werden die Tierversuche und die nachfolgenden Untersuchungen an 80 Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld), wobei je 40 weibliche und 40 männliche Tiere zum Einsatz kamen.

Die Ratten werden im Alter von zwölf Wochen geliefert. Dabei weisen die Tiere zu diesem Zeitpunkt geschlechtsspezifische Unterschiede im Körpergewicht auf: Weibliche Tiere wiegen durchschnittliche 180-240 g, männliche Tiere wiegen 250-300 g.

Nach ihrer Ankunft werden die Tiere zur Gewöhnung an die neue Umgebung zunächst in Gruppenhaltung (maximal vier Ratten) über einen Zeitraum von 16 Tagen in Haltungskäfigen (Makrolon Typ IV, 55 x 35 x 20 cm) untergebracht.

Die Käfige sind mit entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat (Lignocel, J.Rettenmeier & Söhne, Rosenberg) eingestreut und zur Anreicherung der mit einer Hand voll entkeimtem Heu sowie Zellstoff als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial ausgestattet.

Trockenfutter (Altromin 1324, spezial behandeltes Haltungsfutter für Ratten und Mäuse, Altromin GmbH, Lage) über Futterraufen und Wasser über Nippeltränken stehen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Untergebracht sind die Tiere in einem fensterlosen, klimatisierten Tierhaltungsraum mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 ± 15 % und einem durch eine Zeitschaltuhr gesteuerten Hell- / Dunkel- Rhythmus von jeweils 12 Stunden (Hellphase von 03.00 Uhr bis 15.00 Uhr, Dunkelphase von 15.00 Uhr bis 03.00 Uhr). Die Lichtintensität im Käfig beträgt dabei gemäß den Vorschriften für die Haltung von Albinotieren (GV SOLAS GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE, 1988) maximal 60 Lux.

In der Hellphase werden die Tiere zusätzlich mit leiser Radiomusik beschallt, um sie an die menschliche Geräuschkulisse zu gewöhnen.

An Tag 16 nach der Ankunft erfolgen die Kastration bzw. die Scheinkastration der Versuchstiere (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Nach diesem Eingriff werden sie in ihrer jeweiligen Gruppenzusammensetzung zur Regeneration wieder in die Haltungskäfige verbracht und bis zum Tag 30 nach der Ankunft dort belassen (siehe Abb. 07).

Ab Tag 30 nach der Ankunft erfolgt dann die Unterbringung der Tiere in der speziell für die Verhaltensuntersuchungen entwickelten Versuchsbox, dem sog. „Homecage“. In diesem Homecage verbleiben die Tiere dann bis zum Ende des Versuchs.

Die Box misst 80 x 60 x 50 cm, besteht aus blickdichtem, grauen PVC (Fa. Josef Weiss Plastik GmbH, München) und wird gewichtsabhängig besetzt:

Weibchen mit einem Gewicht von 300 bis 400 g werden mit einer Gruppenstärke von 6 Tieren, Männchen bei einem Gewicht von 400 bis 500 g in Gruppen zu 5 Tieren eingesetzt. Einen Tag vor Versuchsbeginn wird der Homecage mit einer transparenten, perforierten Plexiglaswand in zwei gleich große Abteile, einen Wohn- und einen Testbereich unterteilt.

Der gesamte Versuchsablauf lässt sich somit in zwei Abschnitte untergliedern (siehe Abb. 07):

1. Nicht- observierte Testphase mit der Kastration/Scheinkastration an Tag 16 nach Ankunft
2. Observierte Testphase ab Tag 39 (= -2) mit EKZ und 45 min DHCA an Tag 41 (= 0) nach Ankunft, sowie den neurokognitiven Tests.

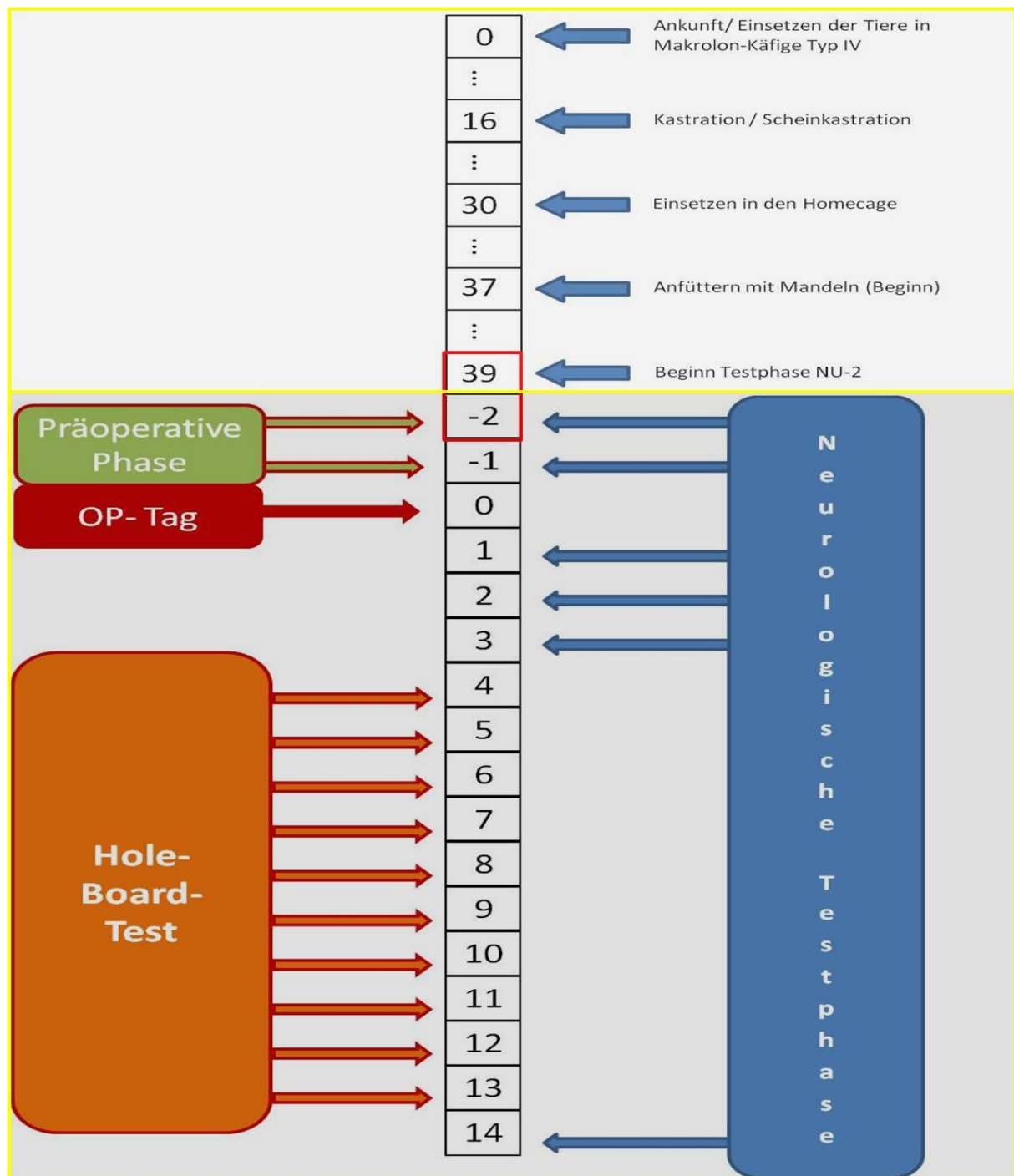


Abb. 07: Zeitplan (d) des Versuchsablaufs von der Ankunft der Tiere bis zum Ende der Versuchsphase. Der rot umrandete Bereich auf der Zeitskala stellt den Übertag zwischen nicht-observierter (hell markierter Bereich) und observierter (dunkler markierter Bereich) Testphase dar.

Insgesamt 80 Tiere, davon je 40 männliche und 40 weibliche, werden in den Versuch einbezogen. Diese werden dann randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen „kastriert“ und „nicht kastriert“ (jeweils 20 Tiere) zugeordnet, von denen wiederum randomisiert OP- Tiere („DHCA“) und Kontrollen („Kontrolle“) mit einer Gruppenstärke von je 10 Tieren (n=10) unterschieden werden. Die Einteilung der Tiere erfolgt randomisiert in 8 je nach Geschlecht getrennten Gruppen zu 10 Tieren (siehe Abb.08).

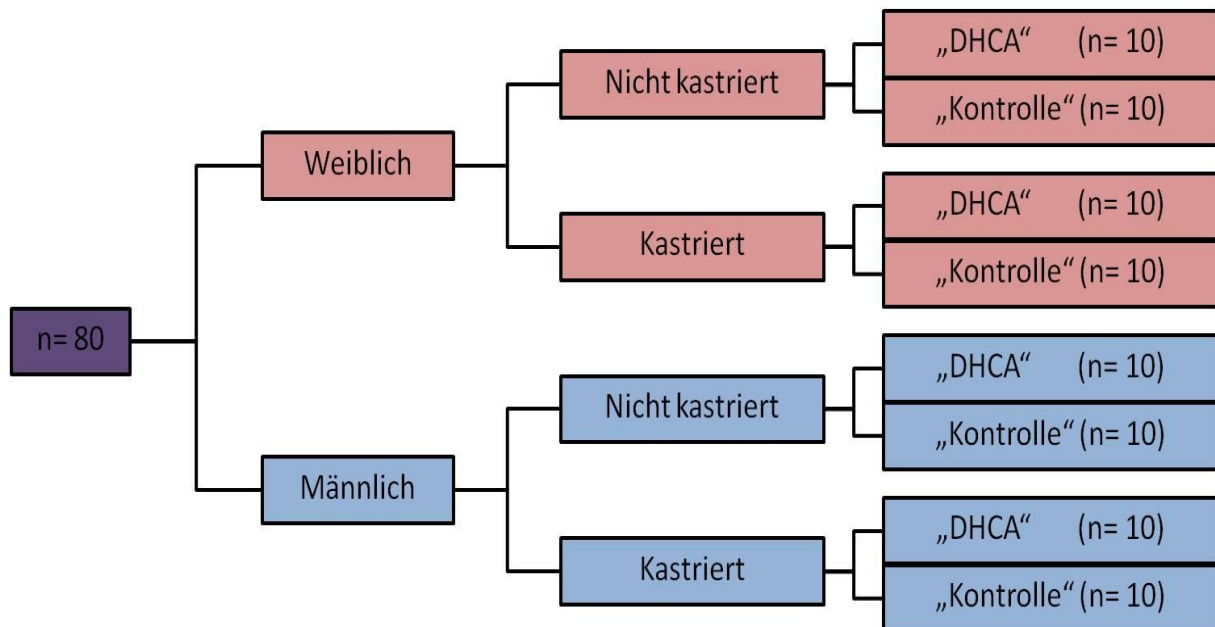


Abb. 08: Schema Versuchsgruppeneinteilung

Die Tiere der DHCA- Gruppen werden einer EKZ mit DHCA unterzogen und anschließend mit dem modifizierten Zylinder Hole Board Test (mZHBT) neurokognitiv untersucht.

Die Tiere der Kontrollgruppen werden keiner EKZ mit DHCA unterzogen, sondern nur mit dem mZHBT neurokognitiv getestet.

An Tag 14 nach EKZ mit DHCA werden die Tiere der DHCA-Gruppen euthanasiert. Die Tiere der Kontrollgruppen werden entsprechend 14 Tage nach Beginn der neurokognitiven Tests getötet. Die Tiere werden dazu in tiefer Isoflurannarkose entblutet, das Gehirn sowie Blutproben entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei – 80 °C gelagert.

3.2.2 Versuchsdurchführung

3.2.2.1 Kastration bzw. Scheinkastration

Den Tieren steht bis zum Zeitpunkt der Anästhesie Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Vor der Kastration bzw. Scheinkastration werden die Tiere einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, um sicher zu stellen, dass es sich um gesunde Tiere handelt. Die Eingriffe werden stets von derselben Person durchgeführt.

Die Anästhesie wird mittels 5,0 Vol% Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und Sauerstoff (6 l/min) in einer durchsichtigen Plexiglasbox eingeleitet. Nach Eintreten der gewünschten Anästhesietiefe mit Bewusstseinsverlust und Ausfall der Stellreflexe, werden die Tiere am Bauch rasiert und anschließend mit einer 14-Gauge-Kanüle endotracheal intubiert. Die Narkose wird über ein Kleintierbeatmungsgerät (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs Elektronik, March) im halboffenen System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von 0,8 l/min, vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und Gasabsaugung aufrechterhalten.

Die Beatmung erfolgt mit 2,0 bis 2,5 Vol% Isofluran in 40 % Sauerstoff, ca. 55 % Druckluft, einer Atemfrequenz von ca. 50 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von 11 - 15 mmHg. Der expiratorische Kohlenstoffdioxid- Partialdruck (etPaCO₂) wird auf Werte zwischen 30 - 40 mmHg eingestellt.

Da die Tiere in der Narkose ihre Augen nicht schließen, werden diese mit einer Salbe (Bepanthen[®] Augen-und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen), sowie die Maulschleimhaut mittels Benetzung durch einen, in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer vor Austrocknung geschützt.

3.2.2.1.1 Weibliche Tiere

Nach der Rasur und 2-maliger Hautdesinfektion mit Cutasept[®] F (Fa. Bode, Hamburg) erfolgt eine subkutane Infiltrationsanästhesie des Inzisionsbereiches unter Verwendung des Lokalanästhetikums Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2 %, Astra Zeneca, UK). Zur Analgesie werden 0,05 ml Fentanyl (5µg Bolus, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) intraperitoneal verabreicht.

Unterhalb des Nabels wird die Haut mit einem Skalpell inzidiert und mit einer feinen Schere erweitert. Als Nächstes folgt die Eröffnung der Bauchhöhle, paramedian zur Linea alba. Nun sucht man dorsal der Blase die Y-förmigen Uterushörner auf, um sich an ihnen orientierend die Ovarien aufzufinden.

Anschließend setzt man zuerst eine Arterienklemme etwas proximal des abzubindenden Gewebes auf, und ligiert mit resorbierbarem Faden (Safil[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) zwischen Eierstocktasche und Hornspitze des Uterus das Ligamentum ovarii mit dem Ramus uterinus der A. und V. ovarica. Jetzt kann das ligierte Gewebe abgesetzt werden.

In einem nächsten Schritt setzt man proximal der Bursa ovarica erneut eine Arterienklemme, um die A. und V. ovarica zu ligieren (Safil[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt). Jetzt kann das gesamte Ovar abgesetzt und entnommen werden.

Nach Entnahme beider Ovarien werden Peritoneum und Bauchdecke zunächst mit resorbierbarem Faden (Vicryl[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) in einer Diagonalnaht verschlossen, um dann die Unterhaut mittels Intrakutannaht (Vicryl[®], Fa. Ethicon, Norderstedt) zu vernähen.

Zuletzt werden zur letzten Sicherheit zwei bis drei Hautknopfhefte (Prolene[®] 4.0, Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) gesetzt.

Die Scheinkastration erfolgt analog dazu. Die Tiere werden narkotisiert und erhalten dieselbe Medikation wie oben beschrieben. Die Schnittführung entspricht ebenfalls der vorher beschriebenen. Nach der Eröffnung des Abdomens werden die Gonaden aufgesucht, jedoch nur durch leichten Zug manipuliert, ohne eine echte Ovariectomie vorzunehmen.

3.2.2.1.2 Männliche Tiere

Nach der Rasur und 2 maligen Hautdesinfektion mit Cutasept[®] F (Fa. Bode, Hamburg) erfolgt die Applikation des Lokalanästhetikums Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2 %, Astra Zeneca, UK) subkutan an der Inzisionsstelle.

Zur Analgesie werden 0,05 ml Fentanyl (5µg Bolus, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) intraperitoneal verabreicht. Dann wird ein Hautschnitt median und kranial des Skrotums gesetzt. Der Schnitt wird stumpf mit einer kleinen Schere geweitet, um sich einen besseren Überblick zu verschaffen. Anschließend wird das Skrotum jeweils links und rechts so weit inzidiert, um die Hoden in den Processus (Proc.) vaginalis vorverlagern zu können. Nach stumpfem Abpräparieren des lockeren Fett- und Bindegewebes kann man den jeweiligen Proc.

vaginalis fassen. Dieser wird mit einem kurzen Schnitt eröffnet um die Hoden freizulegen. Die A. Und V. testicularis werden proximal abgeklemmt, mit einem resorbierbaren Faden (Safil[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) ligiert und per Scherenschlag abgesetzt.

Anschließend wird eine Klemme proximal am Ductus deferens (Samenleiter) und dem Gefäßstrang, bestehend aus A. und V. ductus deferentis platziert und eine Ligatur (Safil[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) um diese gelegt. Die Durchtrennung erfolgt distal der Ligatur. Die ligierten Stümpfe werden zurückverlagert und die Procc. vaginales mit einfachen Knopfheften (Vicryl[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) vernäht.

Danach erfolgt der Verschluss des Hautschnittes. Zuerst wird die Unterhaut mit resorbierbarem Faden (Vicryl[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) mit einfachen Knopfheften und dann die Haut ebenfalls mit Knopfheften mit einem nicht resorbierbaren Faden (Prolene[®] 4.0, Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt) vernäht.

Die Scheinkastration der männlichen Ratten erfolgt in analoger Weise. Auch sie werden anästhesiert und rasiert und erhalten dieselbe Medikation. Das Skrotum wird eröffnet, die Gonaden jedoch nur durch leichten Zug manipuliert ohne eine echte Kastration durchzuführen.

Das Schmerzmanagement umfasst bei allen Tieren außer der Fentanyl- Gabe zusätzlich die orale Verabreichung von je einem Tropfen Metamizol (Novaminsulfon- ratiopharm[®] 2,5 g/ 5 ml, Injektionslösung, Fa. Ratiopharm GmbH, Ulm) prä- sowie unmittelbar postoperativ und einen Tag nach dem Eingriff.

3.2.2.2 Extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA)

3.2.2.2.1 Chirurgische Präparation sowie technische Vorbereitung und Durchführung der EKZ

Anästhesie und Vorbereitung der Tiere erfolgt wie unter Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Tiere zusätzlich am Kopf und an der ventralen rechten Halsseite, den Zugangsstellen zur perikraniellen Temperaturüberwachung und zur Präparation der Vena jugularis externa rasiert werden.

Nach Rasur und Intubation wird zum Zwecke der Temperaturüberwachung eine perikranielle Temperatursonde in den M. temporalis platziert. Dabei lagert man das Tier zunächst auf den Bauch die Haut zwischen rechtem Ohransatz und Schädel desinfiziert und mit Xylocain 2 % (Astra Zeneca, UK) lokal anästhesiert. Danach wird mit einer gelben Kanüle (Sterican[®], Einmal-Injektions-Kanüle, 20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) ein Loch durch Haut und Unterhaut gestochen, bevor die perikranielle Temperatursonde (Newport[®] Hypodermic Needle Temperature Probes, Hyp- 1, Newport Electronics, Santa Ana, USA) im rechten M. temporalis platziert wird.

Anschließend wird das Tier in Rückenlage gebracht (siehe Abb. 09 und 10) und die Präparation der Gefäße in der Reihenfolge durchgeführt: Arteria sacralis mediana (A. sacralis mediana, mittlere Schwanzarterie), Arteria epigastrica cranialis superficialis (A. epigastrica cranialis superficialis, oberflächliche, kraniale Baucharterie) und der Vena jugularis externa (V. jugularis externa, äußere Drosselvene). Die Präparation erfordert prinzipiell folgende Schritte:

Vor jeder Hautinzision wird eine Hautdesinfektion mit Cutasept[®] F (Fa. Bode, Hamburg) durchgeführt. Anschließend wird die Inzisionsstelle mit dem Lokalanästhetikum Xylocain 2 % subkutan infiltriert.

Nach dem Hautschnitt wird das subkutane Gewebe stumpf präpariert und die Gefäße isoliert dargestellt. Das jeweilige Gefäß wird nun distal ligiert (Perma Handseide, 4.0, Ethicon GmbH, Norderstedt) und proximal mit einer Ligatur nur locker umschlungen. Anschließend wird die Gefäßwand mittels einer mikrochirurgischen Schere eröffnet und über diesen Schnitt der mit heparinisierte Vollelektrolytlösung (Thomajonin- Lösung[®], DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gefüllte Katheter in das Gefäßlumen eingeführt. Zum Schluss wird der Katheter mit der vorbereiteten proximalen Ligatur im Gefäß fixiert.

Die A. sacralis mediana wird mit einem 20-Gauge- Venenverweilkatheter (Insyte-WTM, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kanüliert. Unmittelbar nach Legen des Katheters erhält das Tier 150 I.E. Heparin Natrium (Liquemin[®] N 25000, Hoffmann – La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) sowie repetitiv 5 µg- Boli Fentanyl.

Zur Überwachung des mittleren arteriellen Blutdruckes („mean arterial blood pressure“, MAP) wird über die rechte A. epigastrica cranialis superficialis ein angespitzter Polyethylen-Katheter (PE 10, IntramedicTM, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) eingeführt, welcher über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, UK) an einen Monitor (Eagle[®] 4000, Marquette Hellige GmbH, Freiburg) angeschlossen ist.

Nach Anbringen der EKG-Sonden (Eagle[®] 4000, Maquet Hellige GmbH, Freiburg) erfolgt die Präparation der an der kaudoventralen Halsseite befindlichen V. jugularis externa und das Einbringen eines 4,5 Fr großen, mehrfach perforierten Katheters (Dipl. Ing. M. Humbs, Valley) bis in den rechten Vorhof.

Um die Gefäße vor zu starker Austrocknung zu bewahren, werden die Wundränder provisorisch mit Einzelheften (Prolene[®] 4.0, Ethicon GmbH, Norderstedt) adaptiert.

Im Anschluss an die Präparation erfolgt der Aufbau des für die EKZ notwendigen Schlauchsystems (siehe Abb. 09 und 10).

Vom venösen Reservoir (Füllungsvolumen 10 ml, Plexiglas[®], Dipl. Ing. M. Humbs, Valley) läuft ein Schlauch (Innendurchmesser 1,6 mm, Tygon[®], Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) über eine Rollerpumpe (Masterflex[®], Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA), zum speziell für Ratten entwickelten Membranoxygenator (Füllungsvolumen 4 ml) mit integriertem Wärmetauscher. Von dort fließt das oxygenierte Blut über einen Schlauch (Innendurchmesser 1,6 mm, Tygon[®], Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) und einer im arteriellen Abschnitt befindlichen Flusssonde (T 208, Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) über die Schwanzarterie zurück ins Tier.

Der Membranoxygenator besteht dabei aus zwei 12,8 x 12,8 x 2,7 cm großen Plexiglasplatten, zwischen denen sich eine kreuzweise übereinander verklebte, dreischichtige Diffusionsmembran (Hohlfasermembran, Jostra AG, Hirrlingen) mit einer Gasaustauschfläche von 558 cm² befindet. Der im Oxygenator integrierte Wärmeaustauscher ist mit einem temperaturgesteuerten, servoregulierten Wasserbad (Polystat Control, cc2, Peter Huber

Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg) verbunden.

Um vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation das System zu entlüften, füllt man venöses Reservoir, Schlauchsystem und Oxygenator mit 10 ml 6 % Hydroxyethylstärke (HAES 60 mg/ml, Voluven[®], Fresenius Kabi AG, Bad Homburg).

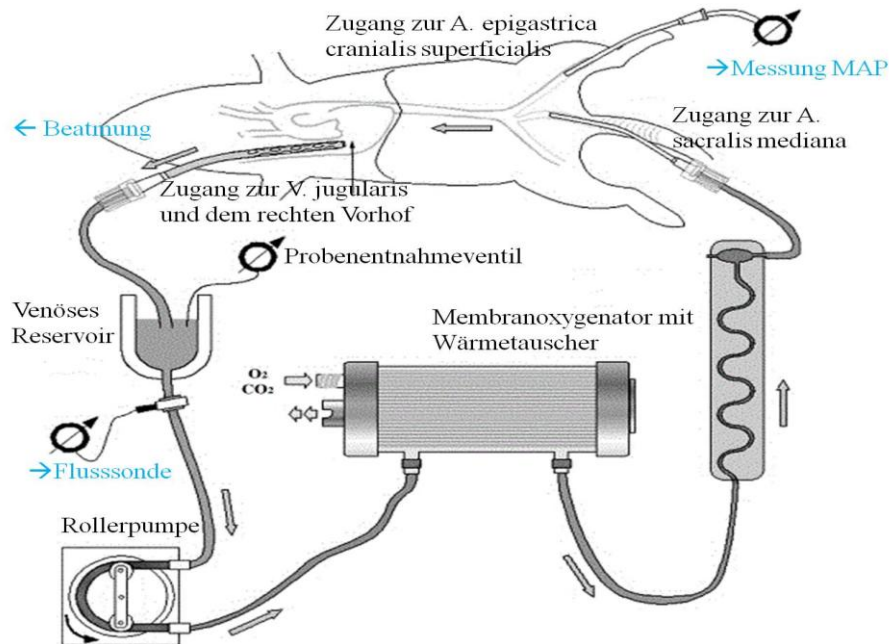


Abb. 09: Versuchsaufbau EKZ (schematisch)

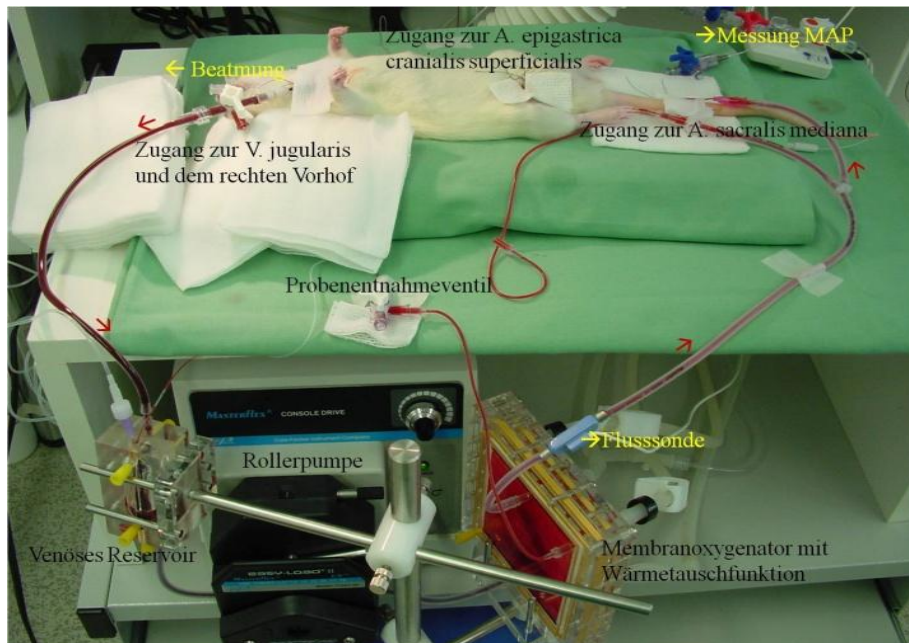


Abb. 10: Versuchsaufbau EKZ (im Foto)

Der Beginn der EKZ erfolgt mit der Drainage des venösen Blutes aus dem rechten Vorhof in das venöse Reservoir. Von dort gelangt es über die Rollerpumpe in den Oxygenator, wo es über die Diffusionsmembran mit Sauerstoff (O₂), Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Isofluran angereichert wird. Das oxygenierte Blut wird anschließend über die Schwanzarterie in den Körperkreislauf zurückgeführt.

Die Blutflussrate beträgt anfangs 160 - 180 ml/min/kg, welche dem physiologischen Herzzeitvolumen der Ratte entspricht. Sie wird im Verlauf der Abkühlungsphase schrittweise auf 105 ml/min/kg gedrosselt.

Das Tier wird dabei mit Hilfe des über die Wärmetauscherfunktion des Oxygenators gekühlten Blutes, als auch über mit Eis gefüllte Handschuhe bzw. einer Kühlmatte innerhalb von 30 min auf eine rektale Temperatur von 18 - 15 °C abgekühlt.

Die Anästhesie wird für die Dauer der Abkühlung mit 0,8 Vol% Isofluran und wiederholten Gaben von Fentanyl- Boli aufrechterhalten. Zisatrakurium (1,6 mg/h, Nimbex[®], GlaxoSmithKline GmbH & Co KG, München) wird als Muskelrelaxans zusätzlich appliziert. Um Atelektasen in der Lunge vorzubeugen, wird das Tier in der Abkühlungsphase mit einem sog. „Continuous Positive Airway Pressure“, (CPAP) beatmet, wobei ein positiver endexpiratorischer Druck von 5 - 10 cm H₂O mit einem FiO₂ = 0,21 aufrechterhalten wird.

3.2.2.2.2 Technische Vorbereitung und Durchführung des DHCA

Nach Erreichen der rektalen Zieltemperatur von 18 - 15 °C, wird die Herz- Lungen- Maschine (HLM) abgeschaltet und das Tier bei geschlossener arterieller Zuflusskanüle und offenem venösem Abfluss passiv in das venöse Reservoir entblutet. Beatmung und Anästhesie werden für die Dauer des tief- hypothermen Kreislaufstillstandes ebenfalls eingestellt. Asystolie und ein MAP von Null werden nun für insgesamt 45 min aufrechterhalten.

3.2.2.2.3 Nachbehandlungsmaßnahmen

Nach 45 min DHCA beginnt die Wiedererwärmungsphase. Mit Hilfe der Heizmatte, eines Warmluftgebläses (Warm Touch® 5200, Nellcor, USA), sowie der Wärmetauscherfunktion des Oxygenators wird das Tier im Lauf von 40 min wieder auf eine rektale Körpertemperatur von 35,5 °C aufgewärmt. Die Blutflussrate wird von anfänglich 105 ml/kg/min auf 120 ml/kg/min bei 20 °C und 150 ml/kg/min bei 30 °C gesteigert, um am Ende der Wiedererwärmungsphase die physiologischen Ausgangswerte von 160 bis 180 ml/kg/min zu erreichen.

Die Anästhesie wird für die Dauer der Wiedererwärmung identisch zur Abkühlungsphase mit 0,8 Vol% Isofluran und einer O₂- und CO₂- Gasmischung in variablen Konzentrationen, um einen PaCO₂ von 30 – 40 mmHg zu halten, aufrecht erhalten. Die Applikation von Fentanyl-Boli (5 µg) zur Analgesie sowie von Zisatrakurium (1,6 mg/h) als Muskelrelaxans wird fortgesetzt, die CPAP-Beatmung ebenfalls fortgeführt.

Ohne den Einsatz von Medikamenten fängt das Herz mit steigenden Temperaturen, nach anfänglichem Kammerflimmern und -flattern, selbsttätig an zu schlagen, bis sich, nach anfänglichen Ersatzrhythmen, der ursprüngliche Sinusrhythmus wieder im EKG darstellt.

Nach Erreichen von 30 °C rektaler Körpertemperatur und einer Blutflussrate von mindestens 150 ml/kg/min erhält das Tier bei Bedarf 20 µg/ml Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol® 1 ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) verabreicht, um den MAP möglichst bei Werten über 45 mmHg zu halten. Um den Basenexzess in einem Bereich zwischen 5 und - 5 zu halten, wird Natriumhydrogencarbonat 84 mg/ml (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gemäß der Formel Bikarbonat = -BE x 0,3 x kg KG verabreicht. Die durch Heparin induzierte Antikoagulation klingt ohne Gabe eines Antagonisten (z.B. Protamin) ab.

Am Ende der EKZ mit Erreichen einer rektalen Körpertemperatur von 35,5 °C werden der venöse Ab- und der arterielle Zufluss abgeklemmt und die Rollerpumpe gestoppt. Das Blut, das sich noch im HLM- Kreislauf befindet, wird gesammelt, bei 2000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das so gewonnen Erythrozytenkonzentrat wird mit HAES (6 %) und Kalziumglukonat (Calciumgluconat, 10 %, Injektionslösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) verdünnt und vorsichtig, unter Berücksichtigung des MAP, über den Katheter in der Schwanzarterie retransfundiert.

Für eine Stunde wird nun die Narkose mit 1,0 bis 1,5 Vol% Isofluran an der intubierten und kontrolliert beatmeten Ratte aufrecht erhalten, und die Rektaltemperatur auf 36,5 °C angehoben.

Während der Nachbeatmungszeit nach Ende der EKZ werden die Katheter entfernt, die Gefäße ligiert, die Hautwunden mit Einzelheften verschlossen. Eine Stunde nach Ende der EKZ wird die Narkose beendet.

Bei Anzeichen suffizienter Spontanatmung wird das Tier in eine Sauerstoffbox verbracht und extubiert, sobald es sich selbstständig von der Rückenlage in die Bauchlage dreht.

Nach dem Eingriff stehen die Tiere noch für vier Stunden unter der ständigen Überwachung des Operateurs und verbleiben noch für insgesamt 18 Stunden (über Nacht bis zum nächsten Morgen) bei freiem Zugang zu Wasser und Futter in einer durchsichtigen Sauerstoffbox.

Offensichtlich schwerwiegend neurologisch beeinträchtigte und Tiere, die ein nachhaltig gestört erscheinendes Allgemeinbefinden (Dyspnoe, zyanotische Veränderungen, schwerwiegende neurologische Ausfallerscheinungen) aufweisen, werden unmittelbar euthanasiert. Alle anderen Tiere werden am ersten postoperativen Tag in ihre vertraute Umgebung in den Homecage zurückgesetzt.

3.2.2.2.4 Probenentnahme und Analysen vor, während und nach EKZ und DHCA

Im Verlauf des gesamten Eingriffs werden zu genau definierten Zeitpunkten Blutproben entnommen („Baseline“ vor Beginn der EKZ, vor Beginn des DHCA, beim Erreichen von 20 °C rektaler Temperatur während der Wiedererwärmung, bei Erreichen von 35,5 °C rektaler Temperatur am Ende der Wiedererwärmung, sowie eine Stunde nach Ende der EKZ).

Zu diesen definierten Zeitpunkten werden neben der Blutgasanalyse (Rapidlab™ 860, Bayer Vital GmbH, Fernwald: PaO₂, PaCO₂, pH, BE, Hkt, Hb) auch rektale und perikranielle Temperatur, MAP, Flussrate und Blutglukose (Glucometer® Elite™, Bayer HealthCare AG, Diagnostics, USA) erfasst und dokumentiert.

3.2.2.3 Neurologisch- motorische Untersuchungen

Die nachfolgend angeführten neurologischen bzw. motorischen Untersuchungen der Tiere sollten es ermöglichen, Erkenntnisse über Defizite in diesem Bereich zu gewinnen.

Einige Parameter lassen sich bereits durch passive Beobachtung der Tiere im Homecage feststellen (z.B. Bewusstsein, Pflegeverhalten und Lokomotion), andere können anhand vielfältiger Testsysteme aktiv erfasst werden. Zur Erhebung neurologisch- kognitiver Defizite in diesen Tests wurde ein spezieller Erhebungsbogen (siehe Abb. 15) entwickelt, anhand dessen graduell unterschiedliche pathologische Abweichungen vom Normalwert beschrieben werden können.

Um die Ratten an die neuen Bewegungsabläufe zu gewöhnen und gleichzeitig die Basiswerte des Normalzustandes zu gewinnen, werden die Tests der neurologischen Untersuchung (NU) bereits am zweiten und ersten präoperativen Tag (-2, -1) durchgeführt. An den Tagen 1, 2, 3 und 14 nach dem Eingriff werden sie fortgesetzt. Alle erfassten Daten ab Tag -1 werden in eine Excel-Tabelle übertragen und zur Auswertung herangezogen.

Die Tests finden immer in derselben Reihenfolge und einem für alle Ratten gleichen Schema statt. Zudem wird darauf geachtet, dass den Tieren zwischen den Testabschnitten genügend Zeit zur Regeneration bleibt. Die Durchführung des Tests erfolgt stets zur selben Zeit möglichst nah an der aktiven Phase der Tiere gegen Ende der Hell- Phase.

Folgende Hilfsmittel werden benötigt:

- zwei Seitenstützen aus unbehandeltem Holz mit einer Höhe von 53 cm
- Schaumstoffmatte mit einer Stärke von 5 cm, umhüllt mit schwarzer Plastikfolie
- ein Balken aus unbehandeltem Holz (130 x 2,5 x 2,5 cm)
- zwei Balken aus unbehandeltem Holz (130 x 1,5 x 1,5 cm)
- Drahtgitter (57 x 49 cm, Lochgitterabstand 0,8 cm, ø Drahtsteg 1 mm)
- Drahtseil (ø 0,3 cm, Länge 67 cm)
- Timer (Hanhart-Labor-Timer, Labor 3, Berlin)
- Digitale Waage (Kern & Sohn GmbH, Balingen)

3.2.2.3.1 Bewusstsein

Um erste Hinweise auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Ratten zu erhalten, werden die Tiere im Wohnabteil beobachtet. Unauffällige Tiere sind neugierig, erkunden die Umgebung und suchen die Nähe zu ihrem Gruppenverband. In ihrem normalen Verhalten beeinträchtigte Individuen sondern sich von ihren Artgenossen ab und zeigen wenig bis kein Interesse an ihrer Umwelt. Auch gleichförmige, immer wiederkehrende Bewegungen (sog. „Stereotypien“) können Hinweise auf ein gestörtes Bewusstsein darstellen.

3.2.2.3.2 Pflegeverhalten

Da Ratten sehr reinliche Tiere sind, ist auch ein eingeschränktes Pflegeverhalten als ein Hinweis auf einen gestörten Gesundheitszustand zu werten. In ihrem Putz- und Pflegeverhalten eingeschränkte Tiere haben ein struppig erscheinendes Fell, in der Augenregion kann sich rötliches Sekret aus den Harder'schen Drüsen ansammeln und die Partie rötlich verkleben. Verschmutzungen des Anogenitalbereiches weisen ebenfalls auf ein gestörtes Putzverhalten hin.

3.2.2.3.3 Laufen/ Bewegung

Motorik, Stellreflexe und Gleichgewicht werden zunächst im Wohnabteil einer ersten Beurteilung unterzogen. Hierbei stellt man fest, ob Störungen in der Lokomotion, wie Lahmheiten, Paralysen, stereotype Bewegungsabläufe oder Stehunfähigkeit vorhanden sind.

Bewertet wird mit Punkten von 0 (= normal) bis 2 (= Kreisbewegungen, schwer beeinträchtigt) (siehe Abb. 15).

3.2.2.3.4 Laufen auf dem Balken („Beam Walking“)

Um Störungen im Bewegungsablauf, des Gleichgewichts, der Stellreflexe und Haltungsasymmetrien feststellen zu können, sollen die Tiere je dreimal eine Strecke von 100 cm auf einem Holzbalken (130 x 2,5 x 2,5 cm) zurücklegen (siehe Abb. 11).

Der Balken wird dazu auf den Seitenstützen in ca. 53 cm Höhe montiert. Um ein eventuelles Fallen der Tiere abzufedern wird darunter eine Schaumstoffmatte platziert. Fehlritte der Vorder- und Hinterbeine werden als Fußfehler gezählt und erlauben eine Einstufung der Störungen (siehe Abb. 15).



Abb. 11: Ratte im Beam Walking- Test.

3.2.2.3.5 Gitter- Dreh- Test („Rotating Grid“)

Zur Beurteilung von Muskelkraft und Gleichgewichtssinn werden die Tiere auf das horizontal gehaltene Drahtgitter gesetzt (0°), welches zunächst in eine vertikale (90°) und anschließend in eine umgekehrte horizontale (180°) Lage gedreht wird. Nun soll sich das Tier für mindestens 5 s kopfüber hängend am Gitter festhalten (siehe Abb. 12).

Kann sich das Tier weniger als 5 s lang am Gitter halten, wird dies als Störung gewertet und in die Beurteilung aufgenommen (siehe Abb. 15).



Abb. 12: Ratte im Rotating Grid- Test.

3.2.2.3.6 Balken- Gleichgewichts- Test („Beam Balance“)

Zur Beurteilung von Muskelkraft und dem Vermögen des Tieres das Gleichgewicht zu halten, werden die Tiere mittig auf einen, wiederum auf den Seitenstützen angebrachten Holzbalken (130 x 1,5 x 1,5 cm) gesetzt (siehe Abb. 13). Die Schaumstoffmatte unterhalb federt die Tiere bei evtl. Stürzen ab. Für insgesamt dreimal 60 s soll sich die Ratte dort halten, wobei zur Regeneration jeweils zwischen den Testabschnitten Pausen von mind. 60 s eingelegt werden. Die Zeit, wie lange die Ratte das Gleichgewicht auf dem Balken halten kann bzw. die Unfähigkeit dazu wird notiert und bildet die Grundlage der Bewertung (siehe Abb. 15).

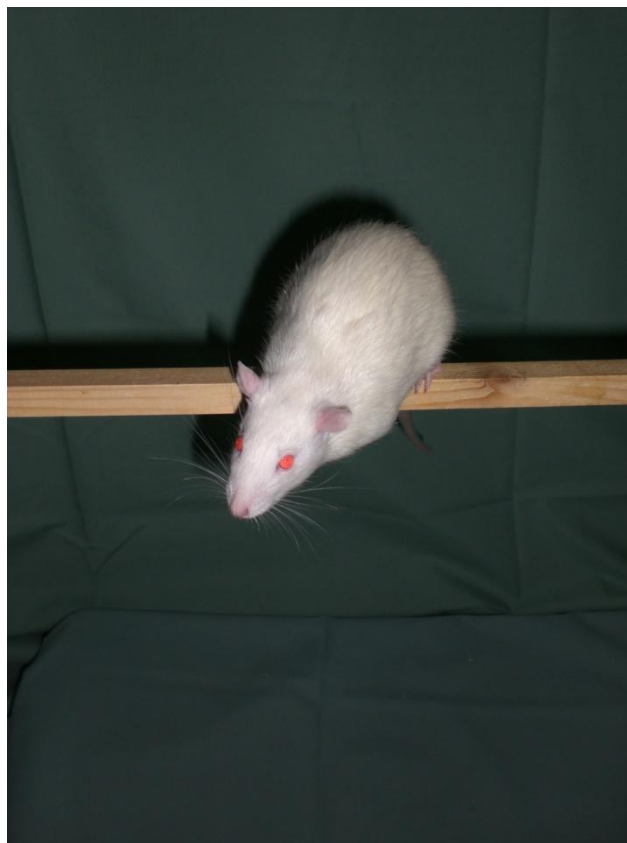


Abb. 13: Ratte im Beam Balance- Test.

3.2.2.3.7 Greif- Zug- Test („Prehensile Traction“)

Bei diesem Test wird zwischen zwei Seitenstützen ein Drahtseil in ca. 53 cm Höhe angebracht. Mit den Vorderpfoten muss die Ratte das Seil ergreifen und sich für mindestens 15 s daran festhalten (siehe Abb.14). Zur Abfederung von Stürzen wird unterhalb wiederum die Schaumstoffmatte ausgelegt.

Gesunde Tiere greifen das Seil symmetrisch, geschädigte Tiere weisen dagegen häufig Defizite (uni- oder bilateral reduzierte Muskelkraft in den Vorderpfoten, uni- oder bilateral verminderter Greifreflex) auf. Bewertet werden die Dauer des Festhaltens in Sekunden, sowie die Symmetrie der Vorderpfoten in der Greif- und Haltephase (siehe Abb. 15).



Abb. 14: Ratte im Prehensile Traction- Test.

3.2.2.3.8 Sensorik- Test

Im Verlauf der Testreihe wird auch die Sensorische Funktion der Tiere getestet. Sie wird dahingehend überprüft, ob die Tiere auf Reize, wie Berührung der Flanken und der Vibrissen (0= Reaktion, 1= eingeschränkte Reaktion, 2= keine Reaktion), Klatschen und Bewegung (0= Reaktion, 1= keine Reaktion) eine Reaktion zeigen. Vermerkt wird jeweils, ob eine Reaktion erfolgt oder nicht und auf welcher Körperseite ein eventuelles Defizit besteht (siehe Abb.15, Punkte 9 bis 12).

3.2.2.3.9 Gewichtskontrolle

Darüber hinaus werden die Tiere am Ende eines jeden Testtages gewogen, um Zu- und Abnahmen des Körpergewichts zu dokumentieren.

Neurologische Untersuchung

Kategorie	Score	Parameter		Bemerkungen
1. Bewusstsein	0 1 2	Normal Gedämpft/ruhelos Lethargisch		
2. Pflegeverhalten	0 1 2	Normal Eingeschränkt Nicht vorhanden		
3. Laufen	0 1 2	Normal Eingeschränkte Mobilität Kreisbewegungen		
4. Beam Walking	0 1 2 3 4	≤ 3 Fußfehler 4-10 11-20 >20 kann nicht laufen	Links:	Rechts: Anzahl:
5. Drehendes Gitter	0 1 2 3	0 1 2 3	Greift bei 180° ≥ 5 sec Greift bei 180° < 5 sec Greift nur bei 90° Fällt vom vertikalen Gitter	Zeit: sec Zeit: sec
6. Beam Balance	0 1 2 3 4	0 1 2 3 4	50-60 sec 30-49 sec 10-29 sec < 10 sec kann sich nicht halten	Zeit: sec Zeit: sec Zeit: sec
7. Movement-Symmetry	0 1 2	0 1 2	Normal Eingeschränkt Nicht vorhanden	Links: Rechts: Links: Rechts:
8. Prehensile Traction	0 1 2 3	0 1 2 3	11-15 sec 6-10 sec 1-5 sec kann sich nicht halten	Zeit: sec Zeit: sec
9. Body Proprioception	0 1 2	0 1 2	Normal Eingeschränkt Nicht vorhanden	Links: Rechts: Links: Rechts:
10. Response to Vibrissae	0 1 2	0 1 2	Normal Eingeschränkt Nicht vorhanden	Links: Rechts: Links: Rechts:
11. Sehen (Wattebausch)	0 1	0 1	Kopfdrehen Keine Reaktion	Links: Rechts: Links: Rechts:
12. Hören (Händeklatschen)	0 1	0 1	Normale Reaktion Keine Reaktion	
13. Body Weight				

Abb. 15: Formblatt zur Dokumentation der Befunde der neurologischen Untersuchungen. Anhand dieses Formblattes wurde die neurologische Untersuchung der Versuchstiere durchgeführt und eventuelle Defizite dokumentiert.

3.2.2.4 Modifizierter Zylinder Hole Board Test (mZHBT)

3.2.2.4.1 Testprinzip

Der modifizierte Zylinder Hole Board Test (mZHBT) ermöglicht es, aufgrund seines visuell-räumlichen Testprinzips, in nur einem einzigen Test kognitive, emotionale und motorische Parameter parallel zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Tests lassen sich neben Lern- und Gedächtnisprozessen auch Verhaltensweisen analysieren, die mit Angst, Neugier, Erregung und dem Sozialverhalten der Tiere in Verbindung gebracht werden. Zudem lassen sich Erkenntnisse über die lokomotorische Aktivität, sowie die motorische Geschicklichkeit der einzelnen Ratten gewinnen.

Grundlage des Tests bildet das sogenannte modifizierte Zylinder Hole Board (mZHB), mit insgesamt zehn Lochvertiefungen, welche alle mit aufgesteckten, nach oben hin offenen Zylindern versehen sind. Alle Zylinder werden mit Mandelplättchen unter einem engmaschigen Abtrenngitter präpariert. Lediglich in drei der Löcher werden zusätzlich Mandelblättchen auf das Drahtgitter platziert, die für die Ratte dann auch erreichbar sind. Die Zylinder auf diesen drei mit erreichbaren Mandeln bestückten Löchern werden zusätzlich mit weißem Klebeband markiert. Diese erreichbaren Mandeln stellen eine Futterbelohnung dar, die das Tier motivieren soll, die Zylinder mit der weißen Klebebandmarkierung aufzusuchen. Sie soll also lernen, die optisch markierten Zylinder mit der Futterbelohnung in Verbindung zu bringen und diese dann gezielt aufzusuchen.

3.2.2.4.2 Technische Ausstattung

Die Tests für die neurokognitive Untersuchung müssen in einer möglichst stressfreien Umgebung stattfinden (siehe [Abb. 16](#)), in der die sehr sozial lebenden Ratten ihre natürlichen Verhaltensweisen aufzeigen können. Der speziell für den modifizierten Hole-Board-Test konzipierte Versuchstierkäfig, auch „Homecage“ genannt, vereint sowohl Tierhaltungsabteil als auch Versuchsarena in einem (siehe [Abb. 17](#)). Nach dem Umsetzen an Tag 30 nach Ankunft aus den Makrolon Käfigen in den Homecage nutzen die Tiere zunächst den gesamten, 80 x 60 x 50 cm großen, mit Weichholzgranulat eingestreuten sowie mit Heu und Zellstoff angereicherten Käfig. Er besteht aus grauen, blickdichten PVC-Platten (eigene Herstellung, Fa. Josef Weiss Plastik GmbH, München). Ein Metallgitter (82 x 61 cm,

Quadratlochung 1 x 1 cm) hindert die Tiere am Herausklettern, ermöglicht aber auch einen ausreichenden Lichteinfall. Futterraufen und Nippeltränken sind an der kurzen Seite des Homecages angebracht.

Einen Tag vor Durchführung der EKZ mit DHCA wird eine durchsichtige, mit Löchern versehene Trennwand (Plexiglas® 59 x 1,5 x 50 cm, ø der Löcher 1,5cm, Lochabstand 5 cm) in den Käfig eingesetzt, welche nun das Haltungsabteil von der Versuchsarena trennt (siehe Abb. 17). Zu diesem Zweck sind an den Längsseiten des Käfigs zwei PVC- U- Profilschienen (13 x 15 x 1,5 mm, Länge je 50 cm) angebracht. Diese Trennwand mit der speziellen Lochung ermöglicht es den Tieren, während der Testphase visuell, olfaktorisch und zum Teil sogar taktil Kontakt mit ihren Artgenossen aufzunehmen.



Abb. 16: Ausstattung des mZHBT- Arbeitsplatzes. Abgebildet sind: PC, Weichtastatur, Test-utensilien, Kamera sowie Homecage.



Abb. 17: Haltungskäfig mit integrierter Testarena.

Bild links: Aufsicht von vorne auf den Homecage mit Tränkeflaschen, Futterraufen und eingezogener Plexiglasscheibe zur Abtrennung von Haltungsabteil (vorne) und Testarena (hinten).

Bild rechts: Aufsicht auf den Homecage, der durch die eingezogene Plexiglasscheibe in Haltungsabteil (unten) und Testarena (mit eingelegtem Zylinder Board, oben) aufgeteilt wird.

Das modifizierte Zylinder Hole Board (mZHB) (siehe [Abb. 18](#)) besteht aus einer 40 x 25 x 1 cm großen, grauen PVC- Platte. In diese Platte sind zehn Lochvertiefungen in drei Reihen und versetzt zueinander eingefräst. Jede Lochvertiefung weist zudem zwei unterschiedliche Stanztiefen auf. Peripher beträgt sie 0,3 cm mit einem Durchmesser von 5 cm, zentral eine Tiefe von 0,6 cm mit einem Durchmesser von 3,5 cm. Alle zehn zentralen Vertiefungen werden mit jeweils drei Mandelstücken beschickt und mit einem Drahtgitter (ø ca. 4,8 cm, Quadratlochung 2 mm) abgedeckt. Anschließend werden auf alle Lochvertiefungen dunkelgraue PVC- Zylinder (ø 5 cm, Höhe 5 cm, Randbreite 2 mm) gesteckt. 3 dieser Zylinder werden am oberen äußeren Rand mit weißem Klebeband (Tesa Isolierband, Tesa AG, Hamburg) markiert. In diese drei markierten Zylinder wird nun auf das Gitter jeweils ein einzelnes, für die Tiere erreichbares Mandelblättchen gelegt. Zum Schluss wird noch jeder Zylinder am oberen Innenrand mit Johannisbeerlösung ausgestrichen, um allen Löchern einen einheitlichen Geruch zu geben und die Appetenz der Tiere zu steigern.



Abb. 18: Modifiziertes Zylinder Hole Board mit 10 nummerierten Zylindern im Foto. Drahtgitterabdeckung der Futterbelohnung in allen Zylindern und erreichbare Futterbelohnung in den markierten Zylindern (hier Zylinder 2, 5 und 8) sind zu erkennen.

Folgende Hilfsmittel werden benötigt:

- Futterbelohnung (blanchierte, gehobelte Mandelblättchen)
- Johannisbeerlösung (Blackcurrant Flavouring Liquid, Th. Geyer, Friedrichsthal; zur Verdünnung 0,012 ml auf 30 ml Leitungswasser)
- Wattetupfer (Noba, Wetter)
- Tesa Isolierband weiß (Tesa AG, Hamburg)
- PC- Desktop Vectra Hewlett Packard, Monitor Samsung SyncMaster 151BM, Weichtastatur Foldable Keyboard (Fold- 2000, Taiwan)
- Beobachtungsprogramm („The Observer[®]“ Version 5.0; Noldus Information Technology bv, Wageningen, NL; ©2003)
- Kamera (Digital- Camcorder- Videokamera, GR- DV 1800, JVC, JP) mit Stativ und Aufnahmekassette (DV 60/ TDK)
- Anatomische Pinzette (Aesculap AG & Co. Kg, Tuttlingen)

3.2.2.4.3 Versuchsplan

Zur Gewöhnung an den Untersucher und die Futterbelohnung bekommen die Ratten an den vier Tagen vor Durchführung der EKZ mit DHCA Mandeln angeboten. Nach der Abtrennung der Versuchsarena am Tag vor dem Eingriff wird die Testarena von Verschmutzungen und Einstreu gereinigt. Nun werden mit demselben weißen Isolierband, das zuvor auch zur Markierung der Zylinder verwendet wurde, vier Markierungen in das Testabteil eingeklebt. Diese dienen dazu, um sog. „Line- Crossings“, Linienquerungen, erfassen zu können, welche der Beurteilung der lokomotorischen Aktivität dienen.

Zum Schluss legt man das, wie oben beschrieben vorbereitete Zylinder Board mittig in die Versuchsarena und belässt es dort zur Gewöhnung bis zum Beginn der Testphase. An Tag vier dieser Phase beginnt dann die kognitive Untersuchung der Tiere, welche bis Tag 13 nach EKZ mit DHCA dauert. Pro Tag finden pro Tier vier Durchläufe mit einer maximalen Zeitspanne von jeweils fünf Minuten (300 Sekunden) statt.

In Tab. 01 ist für jeden Untersuchungstag die randomisiert vorgegebene Kombination der markierten und mit einer Futterbelohnung gefüllten Zylinder wiedergegeben.

Tab. 01: Randomisierungsschema der Lochkombinationen für die Futterbelohnung im mZHB

Tag	Lochkombination
4. Tag	4, 6, 9
5. Tag	1, 5, 7
6. Tag	2, 3, 9
7. Tag	1, 7, 10
8. Tag	3, 5, 7
9. Tag	2, 5, 8
10. Tag	7, 9, 10
11. Tag	3, 6, 9
12. Tag	1, 3, 8
13. Tag	6, 8, 9

4.2.2.4.4 Versuchsaufbau

Die Versuche werden so nah wie möglich an der Aktivitätsphase der dämmerungs- und nachtaktiven Tiere durchgeführt. Somit ergibt sich ein Zeitfenster in der späten Helligkeitsphase zwischen 8.00 und 12.00 Uhr. Zutritt haben in dieser Zeit nur die Untersucher, welche bereits während der Eingewöhnungszeit die tägliche Pflege und Kontrolle der Tiere übernommen haben. Neben der vorgeschriebenen Schutzkleidung (grüne OP- Kleidung, Haube, Atemschutzmaske und raumeigenen Schuhen) ist es gleichermaßen wichtig, starke Geruchsreize (z. B. intensives Deo, Kosmetika, Parfum, Knoblauch) für die Tiere zu vermeiden, um gleichbleibende Bedingungen für den Versuchsaufbau zu schaffen.

Nach dem Abnehmen des Metallgitters wird zunächst adspektorisch das Allgemeinbefinden der Tiere beurteilt. In ihrem Allgemeinbefinden reduzierte Tiere weisen häufig ein struppiges, ungepflegtes Fell auf und sondern sich von der Gruppe ab, bzw. werden gemieden.

Nach der adspektorischen Beurteilung der Tiere wird das mZHBT aus der Versucharena genommen und dieses, wie auch die Arena selbst, mit Zellstoffbahnen, die, falls erforderlich, in klares Wasser getaucht werden, von Schmutz und Einstreuresten gereinigt.

Das mZHBT wird nun in den Vertiefungen mit den Mandeln beschickt, darüber werden die Gitter gelegt und anschließend die Zylinder aufgesteckt. Dann werden alle Zylinder mit der Johannisbeerlösung bestrichen und in die 3 markierten Zylinder zum Schluss noch je ein Mandelblättchen auf das Gitter gelegt. Das nun so vorbereitete Brett wird alsdann in die saubere Versuchsarena gestellt.

Der nächste Schritt erfolgt mit der Eingabe von Identifikationsnummer des Tieres, Versuchstag, Durchlaufnummer und Name des Untersuchers in das PC-Beobachtungsprogramm. Die Kamera auf der kurzen Seite des Käfigs wird eingeschaltet um den Durchlauf zur Absicherung aufzuzeichnen.

Die Tiere werden mit einem gezielten Griff mit der linken Hand an Brust und Bauch aus dem Wohnabteil, mit dem Schwanz zur Trennwand gerichtet, in den rechten hinteren Quadranten der Versuchsarena gesetzt. Zeitgleich zum Einsetzen des Tieres wird mit der rechten Hand das Observationsprogramm gestartet. Die Beobachtungen gibt der Untersucher unter ständiger Beobachtung des Tieres geräuschlos über Tastenkombinationen auf der Tastatur ein (siehe Abb. 19).

Das Programm erfasst die Eingaben, transformiert sie und speichert die Daten für die spätere Auswertung.

Ein Durchlauf ist auf fünf Minuten (300 Sekunden) begrenzt. Findet und frisst eine Ratte vor Ablauf dieser Frist alle 3 Belohnungen, wird die Observation manuell beendet und das Tier zu seinen Artgenossen zurück in das Wohnabteil gesetzt. Um möglichst immer gleichbleibende Bedingungen zu schaffen, geht man bei den nachfolgenden Tieren identisch vor und ändert nach einem kompletten Gruppen- Durchlauf die Reihenfolge der einzelnen Tiere.

3.2.2.4.5 Erhobene Parameter

Im mZHBT werden Parameter erhoben, die sich Gedächtnissystemen (kognitive Parameter), Verhaltensweisen (Verhaltensparameter) sowie motorischen Fähigkeiten (motorische Parameter) zuordnen lassen.

3.2.2.4.5.1 Kognitive Parameter

Über den mZHBT kann die Lernleistung, die sich über die Gesamtzeit des Durchlaufes („Time Complete“, TC, Durchlaufgesamtzeit) definiert, ermittelt und verglichen werden. Die Funktion des deklarativen Gedächtnisses (Hippokampus) wird über die Anzahl an falsch besuchten Löchern („Wrong Choices“, WC, Fehlbesuche), sowie über die Anzahl an nicht besuchten markierten Zylindern („Omission Errors“, OE, Auffindungsfehler) bestimmt und bewertet. Als Indikator des Arbeitsgedächtnisses (präfrontaler Kortex) gilt die Anzahl wiederholt besuchter, geleerter Löcher („Repeated Choices“, RC, Wiederholungsfehler).

3.2.2.4.5.2 Motorische Parameter

Die motorischen Fähigkeiten der Tiere werden in erster Linie in der neurologischen Untersuchung (NU) ermittelt. Jedoch bietet auch die Untersuchung im mZHBT gewisse Möglichkeiten motorische Dysfunktionen festzustellen. So gilt die Fresszeit („Time per food intake“), welche durch die Zeit definiert wird, die die Ratte benötigt um die Futterbelohnung zu fressen, als ein Indikator für die Feinmotorik. Die Geschicklichkeit wird anhand der Anzahl nicht zum Erfolg führender Besuche eines gefüllten Zylinders beurteilt („Frustrane hole visits“, frustrane Lochbesuche). Dabei handelt es sich um Besuche eines markierten und befüllten Zylinders, jedoch wird dabei die Futterbelohnung nicht erkannt oder nicht entnommen und gefressen.

3.2.2.4.5.3 Verhaltensparameter

Mit Hilfe des mZHBT lassen sich zusätzlich auch noch verschiedene Verhaltensmuster differenzieren, wie Angstverhalten, Allgemeinbefinden, soziale Affinität, Erregung, gerichtete und ungerichtete Exploration, sowie Bewegungsaktivität.

Die auf dem Board verbrachte Gesamtzeit („Time on Board“), die verstrichene Zeit (Latenz)

bis zum ersten Boardbesuch („Latency first entry on Board“) und die Anzahl der Boardbesuche („Number of Board entries“) gelten als Indikatoren für das Angstverhalten.

Die Dauer der Inaktivitätsphasen („Immobility“) an der Gesamtzeit spiegelt das Allgemeinbefinden wider.

Die soziale Affinität kann anhand der Häufigkeit der Kontaktaufnahmen zu den Artgenossen über die perforierte Trennwand („Group contact“) ermittelt werden.

Die Latenz bis zum ersten Lochbesuch („Latency first hole visit“) und die Anzahl aller besuchten Löcher („Number of hole visits“) liefern Erkenntnisse über die gerichtete Exploration, wohingegen das Aufrichten auf die Hinterbeine („Rearing“) als ungerichtete Exploration gewertet wird.

Die Gesamtzeit der Putzphasen („Grooming“) sowie die Häufigkeit der Defäkationen („Boli“, „Urin“) geben Hinweise auf die Erregung der Tiere.

Die allgemeine Bewegungsaktivität wird im mZHBT anhand der Anzahl der Linienüberquerungen („Line crossing“) bestimmt.

<u>Aktion</u>	<u>Tastenbelegung</u>	<u>Definition</u>
Beginn	Mausklick auf „GO“/ Entertaste	Loslassen des Tieres aus/von der Hand
Schnuppern Trennwand Beginn =Group contact (=GC)	z	Durchstecken der Nase durch ein Trennwandloch
Schnuppern Trennwand Ende (=OFF)	j (beendet vorherige Phase)	Ende bei Abwenden oder anderer Aktion Schnuppern vom Board aus =Verlässt Board
Betritt Board (=Board)	r	Zielgerichtetes Betreten des Boards mit 2 Pfoten oder 1 Pfote und Schnauze
Verlässt Board (=Box)	v	Zielgerichtetes Verlassen des Boards mit 2 Vorderpfoten
Loch 1/2/3 (CHV 1,2,3)	f,g,h	Aktives Aufsuchen eines markierten Zylinders
Beginn Motor skill	d	Nase unterhalb Ebene Zylinder
Ende Motor skill (=OFF)	j (beendet vorherige Phase)	Tier wendet sich ohne zu fressen vom Loch ab (=HV)
Fressen Beginn =Food intake on (FI ON(BOX)) (FI ON(BOARD))	x c	Tier beginnt in der Box zu fressen Tier beginnt auf dem Board zu fressen
Fressen Ende (=OFF)	j (beendet vorherige Phase)	Kauvorgang beendet
Wiederholer= Repeated choice (=RC)	l	Aktives Aufsuchen eines Lochs nach vorherigem Besuch mit Futteraufnahme (nach korrektem Besuch nochmaliges nachgucken ob leer/ auch Loch ausschlecken)
Falsches Loch= Wrong choice (=WC)	k	Falsches Loch (nicht markiert)
Rearing (=Männchen machen)	t	Erheben auf die Hinterbeine, auch innerhalb einer Schnupperphase oder Fressphase
Groom (Box) Beginn	u	Putzen, Kratzen in der Box
Groom (Board) Beginn	5	Putzen, Kratzen auf dem Board
Groom (Box/Board) Ende	j (beendet vorherige Phase)	
Inaktivität Imb (Box) Beginn	i	Keine Aktivität ab 3-5 s stillen Sitzens in der Box Keine Aktivität ab 3-5 s stillen Sitzens auf dem Board
Imb (Board) Beginn	6	
Inaktivität Ende (=OFF)	j (beendet vorherige Phase)	Bewegung, Aktion
Hole Visit	f,g,h ohne FI ON, aber mit Motor skill	Besuch eines korrekten Loches ohne Futteraufnahme
Line Crossing (Lc)	e	Zielgerichtetes Übertreten der Linie mit beiden Vorderpfoten
Urinabsatz	n	
Bolus	b	Kotabsatz

Abb. 19: Formblatt zur Registrierung der Aktionen von Ratten im mZHBT. Die Rohdaten zur Erfassung der kognitiven Leistung im mZHB- Test werden anhand von Tastaturbefehlen in das Observationsprogramm eingegeben. Jeder Tastaturbefehl steht dabei für eine ganz bestimmte Aktion des Tieres, welche nach einer vorgegebenen Definition erfolgt sein muß.

3.2.2.5 Euthanasie und Probenentnahme

Am Ende der 14-tägigen postoperativen kognitiven und neurologischen Testphase wird den Ratten in tiefer Isoflurannarkose (5 Vol% , MAC 5) direkt aus dem Herzen Blut entnommen, davon ein Teil sofort für eine Blutbildanalyse (pocH-100 iV Diff[®], Sysmex Corp., Kobe, JP) verwendet, der restliche Teil zentrifugiert und das gewonnene Serum bis zur weiteren Analyse bei – 80 °C aufbewahrt.

Danach werden die Tiere mittels Scherenschlag dekapitiert und das Gehirn freipräpariert.

Das in toto entnommene Organ wird mit der Ventralseite auf ein Metallplättchen auf Trockeneis gelegt und, sobald es komplett durchgefroren ist, in einem aus Aluminiumfolie hergestellten Röhrchen bis zur weiteren Bearbeitung bei – 80 °C aufbewahrt.

3.2.2.6 Bestimmung der Geschlechtshormonkonzentration

Die Konzentration der Geschlechtshormone wird in Serumproben bestimmt. Die Blutentnahme hierfür erfolgt am Tag 14 nach EKZ und DHCA im Rahmen der Euthanasie. Zur Bestimmung werden Elektrochemilumineszenz- Immunoassays mit Hilfe des Elecsys[®] 2010 Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim) herangezogen. Testosteron, 17 β - Östradiol und Progesteron werden im Doppelansatz gemessen. Die Standardabweichung („root mean square deviation“, RMSD), der arithmetische Mittelwert („mean value“, MV) und die Referenzwerte („reference ranges“, ref) dieses Hormon- Immunoassays stellen sich wie folgt dar:

Testosteron gesamt: % RMSD 4.43 %, MV 1.57 ng/ml, n = 45; ref 0.2 - 0.8 ng/ml.

17 β - Östradiol: % RMSD 9.26 %, MV 66.50 pg/ml, n = 44; ref 30 - 120 pg/ml prä- und postovulativ, 10 - 30 pg/ml postmenopausal.

Progesteron: % RMSD 5.56 %, MV 8.52 ng/ml, n = 42; ref 0.2 - 0.9 ng/ml prä- und postovulativ, 0.1 – 0.3 ng/ml postmenopausal.

3.2.2.7 Histologische Untersuchung

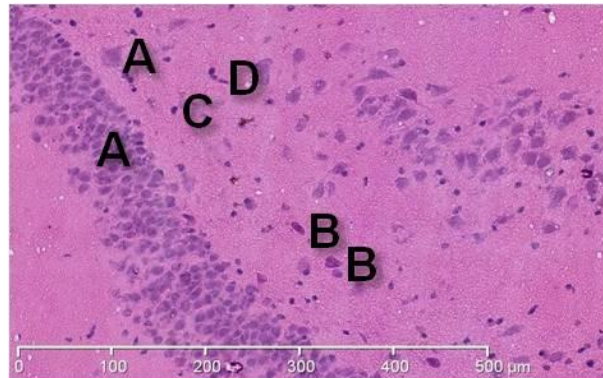
Für die Anfertigung der Schnitte für die histologische Untersuchung werden die Gehirne aus dem – 80 °C Gefrierschrank genommen, über Nacht bei - 20 °C gelagert und am nächsten Morgen mit einem Kryostat- Mikrotom (HM 355, Microm International GmbH, Walldorf) geschnitten. Von zwei, unter Zuhilfenahme des Hirnatlas der Ratte von PAXINOS und WATSON (1998) definierten Ebenen, werden nun koronare Schnitte - 0,3 und - 3,3 mm kaudal des Bregma angefertigt (PAXINOS und WATSON, 1998). Bei einer Objekttemperatur von - 20 bis - 18 °C werden von beiden Ebenen Schnitte mit einer Dicke von 7 µm erstellt und davon jeweils zwei Schnitte auf einen Superfrost- Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die, für die mikroskopische Befundung fertigen Schnitte sowie das restliche Gehirn werden wieder bei - 80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Mittels der Hämatoxylin- Eosin (HE)- Färbung erfolgt die Bestimmung der neuronalen Zellschädigung. Dazu werden die vorbereiteten Schnitte aus dem Gefrierschrank entnommen, nach einem Standard-Protokoll gefärbt (ROMEIS et al., 2010), eingedeckt und bei Zimmertemperatur in einem Objektträgerkasten aufbewahrt.

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axiolab, Fa. Zeiss, Jena) werden die gefärbten Schnitte von einem gegenüber den Versuchsgruppen „geblindeten“ Untersucher durch manuelles Auszählen ausgewertet. Bei 400-facher Vergrößerung ermittelt er die neuronale Zellschädigung in drei unterschiedlichen Gehirnarealen: dem frontalen Kortex (motorisches Zentrum, Motorkortex), dem Hippokampus und dem Striatum. Die Auswertung erfolgt bilateral jeweils mit Hilfe fünf sog. „hoch vergrößerter Felder“ („High Power Field“, HPF).

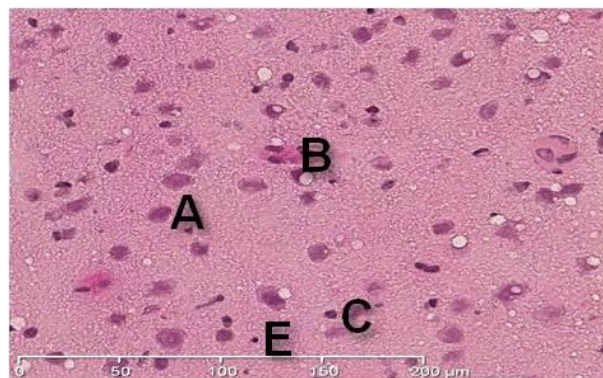
Intakte Neurone weisen in der HE-Färbung eine runde Form, blass lilafarbenes Zytoplasma und einen deutlich erkennbaren Nukleus mit Nukleolus auf. Geschädigte Neurone zeichnen sich wie folgt aus: Eine dreieckige bzw. unregelmäßige Form, ein eosinophiles, kräftig pinkes Zytoplasma, einen kondensierten dunkel gefärbten Zellkern und einen zumeist nicht mehr eindeutig erkennbaren Nukleolus. Befunde von sog. „Dark Neurons“ mit hochgradig basophilem Zytoplasma, pyknotischem Zellkern sowie ohne erkennbaren Nukleolus ordnet man ebenfalls geschädigten Neuronen zu (siehe Abb. 20).

Die Neuronenschäden werden anhand eines etablierten Scores bewertet. Dieser Score reicht von Werten um 0 (= < 5 geschädigte Neurone) über 1 (= 5-10 geschädigte Neurone), 2 (= > 10 geschädigte Neurone) bis 3 (= Infarkt). Daraus ergibt sich für jede Hirnregion ein maximaler Score- Wert von $2 \times (5 \times 3) = 30$, sowie ein maximaler Wert für alle Regionen zusammen von $3 \times [2 \times (5 \times 3)] = 90$, als Darstellung für eine maximale Schädigung.

1)



2)



3)

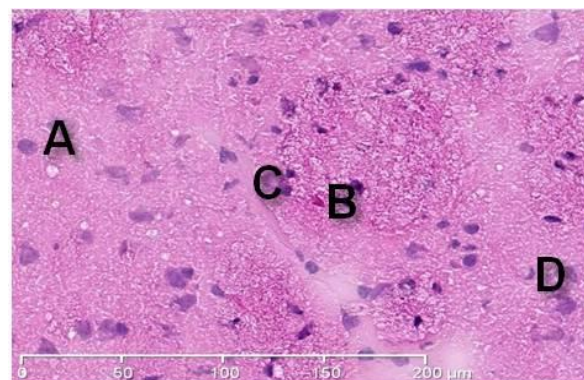


Abb. 20: Beispiele für HE- gefärbte histologische Schnitte aus den drei relevanten Hirnbereichen: Hippokampus, Kortex und Striatum.

1) Ammonshorn, Cornu ammonis- Region 4 (CA4- Region) des Hippokampus,

2) Motorkortex,

3) Striatum mit ungeschädigten und geschädigten Neuronen sowie aktivierten Immunzellen als Hinweis auf eine inflammatorische Reaktion.

A: ungeschädigte Neurone; B: geschädigte Neurone; C: segmentkernige Granulozyten; D: aktivierte Mikroglia; E: Lymphozyten.

3.2.2.8 Statistische Grundlagen der Auswertung

Alle in den Untersuchungen gewonnenen physiologischen Rohdaten wurden mit Hilfe allgemeiner linearer Modelle analysiert, mit den Zwischengruppenfaktoren Geschlecht und Hormonstatus, dem Innergruppen Faktor Zeit und deren Wechselwirkungen. Für die physiologischen Parameter wurde der Einflussfaktor Zeit quadratisch hinsichtlich biphasischer Veränderungen im Untersuchungszeitraum analysiert. Die post hoc Tests für die fünf Messzeitpunkte („Baseline“, „prä-DHCA“, „post-DHCA“, „EKZ Ende“ und „1h post EKZ“) wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse, gefolgt von Bonferroni t-Tests durchgeführt. Neurokognition, Verhalten und Motorik sind linear dargestellt, ergänzt durch Box Plots der Mittelwerte über die gesamten 14 Untersuchungstage nach DHCA. Die Werte wurden mit Hilfe des allgemeinen linearen Modells mit den Zwischengruppenfaktoren Geschlecht (Weiblich gegen Männlich) und Hormonstatus (Intakt gegen Kastriert) und dem Innergruppenfaktor Zeit und den jeweiligen Wechselwirkungen der Einflussgrößen analysiert. Die Daten aus den neurologischen Untersuchungen der Motorik wurden quadratisch analysiert, gefolgt von post hoc einfaktorieller Varianzanalyse mit- falls angebracht- Bonferroni t-Test. Die histomorphologischen und biochemischen Ergebnisse wurden nicht parametrisch mit dem Kruskal Wallis -Test, gefolgt von post hoc Mann-Whitney-U, analysiert. Die Daten sind als Box Plots dargestellt. Die 95 % Konfidenzintervalle der unbehandelten Kontrollgruppen sind als graue Bereiche in die Box Plots mit eingetragen. Wann immer in den Kontrollgruppen Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den untersuchten Parameter hatten, sind die vier einzelnen Kontrollgruppen zu einer großen Kontrollgruppe zusammengefasst worden. Sobald bei den Kontrollgruppen Geschlecht und/oder Hormonstatus einen Einfluss auf die untersuchten Parameter hatten, ist jede Kontrollgruppe mit einem eigenen Kontrollbereich dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des „Software Package Used for Statistical Analysis, IBM SPSS Statistics“, 19.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, United States).

4 Ergebnisse

4.1 Parametrische physiologische Befunde vor, während und nach EKZ und DHCA

Während des herzchirurgisch typischen Eingriffs werden folgende physiologische Parameter erhoben und zu bestimmten Messzeitpunkten dokumentiert (siehe Abschnitt 3.2.2.2.4): der mittlere arterielle Blutdruck („mean arterial pressure“, MAP, mmHg); die Hämoglobinkonzentration (Hb, mg/dl); der arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂, mmHg); der Basenüberschuss, („base excess“, BE, mmol/l); und die Blutglukosekonzentration (Glukose, mg/dl).

Die Messungen werden zu fünf definierten Messzeitpunkten durchgeführt (siehe Tab. 02):

1. Zehn Minuten vor Beginn der EKZ („Baseline“), 2. vor dem Beginn des DHCA („prä-DHCA“), 3. fünf Minuten nach Start der Wiedererwärmung („post-DHCA“), 4. fünf Minuten vor dem Abgehen von der EKZ („EKZ Ende“) und 5. eine Stunde nach Beendigung der EKZ („1h post EKZ“).

Der **mittlere arterielle Blutdruck (MAP)** fällt Protokoll-gemäß im Verlauf der operativen Phase bei allen Gruppen ähnlich ab, kehrt aber bis zur 5. Messung 1 Stunde nach EKZ etwa wieder auf Ausgangsniveau zurück. Der MAP wird um den Messzeitpunkt „EKZ Ende“ durch wiederholte Norepinephrin-Gaben (1-2 µg Boli) auf einen Wert um 50 mmHg gehalten (Norepinephrin-Dosen: männlich kastriert 14 ± 2 µg männlich intakt 17 ± 3 µg, weiblich kastriert 15 ± 3 µg, weiblich intakt 15 ± 2 µg) und somit durch aktives Eingreifen in physiologischen Grenzen gehalten und darum zu diesem Zeitpunkt auch nicht statistisch analysiert (1).

Bei der **Hämoglobinkonzentration (Hb)** zeigt sich, dass die Gruppe der männlich intakten Tiere vor Beginn der EKZ eine höhere Hämoglobin-Konzentration hat. Bei den drei folgenden Messzeitpunkten vor Beginn des DHCA („prä-DHCA“), 5 min nach Beginn der Wiedererwärmung („post-DHCA“) und 5 min vor dem Abgehen von der EKZ („EKZ Ende“) bestehen allerdings keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen. Eine Stunde nach EKZ zeigt die Gruppe der weiblich kastrierten Tiere die höchste Hämoglobinkonzentration.

Der **arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO₂)** ist zum Messzeitpunkt „Baseline“ in der Gruppe der männlich intakten Tiere signifikant höher im Vergleich zu den übrigen drei Gruppen. Im weiteren Verlauf unterscheiden sich jedoch die Werte zwischen den Gruppen nicht mehr.

Der **Basenüberschuss (BE)** ist zu Beginn des Versuchs („Baseline“) bei den männlich intakten Tieren am höchsten. 5 min vor Beginn des DHCA zeigen beide männlichen Gruppen, intakt und kastriert, deutlich höhere (positive) BE Werte als die weiblichen Gruppen.

5 min nach Ende des DHCA zeigen die weiblich intakten Tiere einen signifikant niedrigeren BE als die übrigen drei Gruppen. Der BE wird ab dem Messzeitpunkt „EKZ Ende“ bis zum Ende des Eingriffs mit Hilfe von Natriumbikarbonat (NaHCO_3) zwischen -3 und 3 mmol/l eingestellt (Natriumbikarbonat-Dosen: männlich kastriert 12.6 ± 4.4 mg/ml männlich intakt 11.8 ± 3.8 mg/ml, weiblich kastriert 19.3 ± 4.7 mg/ml, weiblich intakt 36.5 ± 5.2 mg/ml) und somit durch aktives Eingreifen in physiologischen Grenzen gehalten und darum zu diesen Zeitpunkten auch nicht statistisch analysiert (2).

Die **Blutglukosekonzentration** ist zum Messzeitpunkt „Baseline“ bei allen Tieren ähnlich. Sie steigt im Verlauf von EKZ und DHCA kontinuierlich bis zum Ende der EKZ an. Eine Stunde nach Ende der EKZ sind die Werte ähnlich zu den Ausgangswerten. Lediglich die Gruppe der männlich intakten Tiere zeigt auch 1 h nach Ende der EKZ eine signifikant höhere Blutglukosekonzentration im Vergleich zu den übrigen drei Gruppen.

Tab. 02: Mittlere (\pm STABW) Parametrische physiologische Befunde der DHCA- Gruppen vor, während und nach EKZ und DHCA zu den definierten Messzeitpunkten

	Sex	Hormon-status	Base-line	prä-DHCA	post-DHCA	EKZ Ende	1h post EKZ	Zeit ² x Gruppe	Zeit ²	Gruppe ²
Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	W	kastriert	99 \pm 4	52 \pm 9	42 \pm 3	1)	94 \pm 5	n.s.	<	<
	W	intakt	89 \pm 4	62 \pm 5	52 \pm 5		90 \pm 4			
	M	kastriert	80 \pm 3	53 \pm 5	50 \pm 3		76 \pm 4			
	M	intakt	89 \pm 5	53 \pm 6	62 \pm 4		79 \pm 6			
Hämoglobin Konzentration mg/dl	W	kastriert	14.6 \pm 0.3	6.8 \pm 0.1	6.4 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	10.7 \pm 0.2 #	0.023	<	<
	W	intakt	14.2 \pm 0.7	6.9 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	6.7 \pm 0.2	10.1 \pm 0.1			
	M	kastriert	14.7 \pm 0.3	7.1 \pm 0.1	6.9 \pm 0.1	7.1 \pm 0.2	10.1 \pm 0.2			
	M	intakt	15.4 \pm 0.4 §	7.0 \pm 0.1	6.6 \pm 0.2	7.0 \pm 0.2	10.1 \pm 0.1			
PaO ₂ [mmHg]	W	kastriert	149 \pm 12	574 \pm 18	440 \pm 12	410 \pm 7	170 \pm 27	0.004	n.s.	n.s.
	W	intakt	181 \pm 14	526 \pm 17	428 \pm 10	359 \pm 17	166 \pm 15			
	M	kastriert	176 \pm 18	548 \pm 14	422 \pm 13	397 \pm 17	145 \pm 21			
	M	intakt	238 \pm 23 *	993 \pm 66	414 \pm 12	378 \pm 13	234 \pm 33			
BE [mmol/L]	W	kastriert	2.8 \pm 0.4	1.6 \pm 0.4	-1.3 \pm 0.6	2)	2)	0.001	<	n.s.
	W	intakt	2.6 \pm 0.5	-0.3 \pm 0.5	-4.1 \pm 0.6 #					
	M	kastriert	4.7 \pm 0.6 *	2.9 \pm 0.7 §	-0.2 \pm 0.7					
	M	intakt	3.8 \pm 0.3	2.5 \pm 0.5 §	-0.5 \pm 0.4					
Glukose [mg/dL]	W	kastriert	140 \pm 8	153 \pm 5	227 \pm 6	258 \pm 7	154 \pm 10	0.01	<	<
	W	intakt	127 \pm 6	141 \pm 15	225 \pm 13	280 \pm 23	181 \pm 21			
	M	kastriert	150 \pm 11	154 \pm 13	226 \pm 15	270 \pm 9	215 \pm 15			
	M	intakt	147 \pm 19	160 \pm 20	246 \pm 20	324 \pm 21	240 \pm 33 *			

Signifikanzen: * = $p < 0.05$ gg. weiblich kastriert, § = $p < 0.05$ gg. weiblich normal, # = $p < 0.05$ gg. alle Gruppen

4.2 Geschlechtshormonspiegel an Tag 14 nach EKZ und DHCA

Die Geschlechtshormonspiegel im Serum werden aus Blutproben bestimmt, die an Tag 14 nach EKZ mit DHCA bei den Versuchstieren und nach Abschluss der 14- tägigen Testphase bei den Kontrollen gewonnen werden (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Es zeigt sich (siehe Tab. 03(a)), dass alle Hormonwerte im erwarteten Bereich liegen. So haben beispielsweise die weiblich intakten Tiere den höchsten 17 β - Östradiol- und Progesteron- Spiegel, die intakten männlichen Tiere die höchsten Testosteron- Spiegel. Die Tiere der DHCA-Gruppen haben zusätzlich noch signifikant höhere 17 β - Östradiol- Werte im Vergleich zu den Tieren der entsprechenden Kontrollgruppen (siehe Tab. 03 (b)).

Tab. 03 (a): Mittlere (\pm STABW) Geschlechtshormonkonzentration im Serum der DHCA-Gruppen an Tag 14 nach EKZ und DHCA

Tiergruppe			Geschlechtshormonspiegel im Serum					
Geschlecht	Hormonstatus		17 β - Östradiol (pg/ml)		Progesteron (ng/ml)		Testosteron (ng/ml)	
weiblich	kastriert	MW	22,9	§	3,1		0,0	
		\pm STABW	4,7		1,7		0,0	
weiblich	intakt	MW	34,3	*§	17,7	*	0,0	
		\pm STABW	10,9		12,6		0,0	
männlich	kastriert	MW	20,2	§	3,8		0,0	
		\pm STABW	4,5		1,8		0,0	
männlich	intakt	MW	20,2	§	1,7	+§	4,4	*
		\pm STABW	4,5		0,2		2,2	

Signifikanzen: * = $p < 0,05$ gg. alle übrigen Gruppen; + = $p < 0,05$ gg. männlich kastriert; § = $p < 0,05$ gg. Kontrolltiere.

Tab. 03 (b): Mittlere (\pm STABW) Geschlechtshormonkonzentration im Serum der Kontrollgruppen an Tag 14 nach EKZ und DHCA

Tiergruppe			Geschlechtshormonspiegel im Serum					
Geschlecht	Hormonstatus		17 β - Östradiol (pg/ml)		Progesteron (ng/ml)		Testosteron (ng/ml)	
weiblich	kastriert	MW	18,52		4,6		0,0	
		\pm STABW	3,0		1,9		0,0	
weiblich	intakt	MW	29,5	*	20,1	*	0,1	
		\pm STABW	23,1		16,5		0,0	
männlich	kastriert	MW	15,3		2,6		0,0	
		\pm STABW	3,6		1,2		0,0	
männlich	intakt	MW	16,2		2,7		4,2	*
		\pm STABW	2,6		1,2		1,4	

Signifikanz: * = $p < 0,05$ gg. alle übrigen Gruppen.

4.3 Körpergewichtsentwicklung

Die Tiere werden im Verlauf des Versuches prä-, peri-, und postoperativ an den Tagen -1, 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, und 14 gewogen und das mittlere Körpergewicht (g) der jeweiligen DHCA- oder Kontrollgruppe dokumentiert (siehe Tab. 04 und 05). Bereits präoperativ zeigen sich geschlechts-spezifische Unterschiede: Bei gleichem Lebensalter sind die männlichen Tiere (blaue Kurven) insgesamt signifikant schwerer als die weiblichen Tiere. Die Ergebnisse über den Verlauf gesehen (siehe Abb. 21 (A)) zeigen einen signifikanten Einfluss der Zeit (Zeit²: $p \leq 0,001$). Die Abbildung 21 (B) zeigt im Gesamtmittelwert über 14 Tage signifikante Unterschiede bei den Ergebnissen zwischen den Gruppen sowohl in Bezug auf das Geschlecht (* = $p \leq 0,001$), als auch in Bezug auf den Hormonstatus (§ = $p \leq 0,001$). Dieselbe Entwicklung zeigt sich ebenso beim Gewicht der Kontrolltiere (siehe Abb. 21 (C, D)). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse einen signifikanten Einfluss des operativen Eingriffs ($p = 0,034$).

Tab. 04: Prä-, peri-, und postoperatives mittleres (\pm STABW) Körpergewicht in g der DHCA-Gruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag										
Geschlecht	Hormonstatus		-1	0	1	2	3	4	6	8	10	12	14
weiblich	kastriert	MW	354	354	338	328	327	331	333	337	343	350	353
		\pm STABW	22	22	18	18	18	21	19	21	21	22	22
weiblich	intakt	MW	300	300	292	287	290	290	293	301	307	310	308
		\pm STABW	15	15	20	23	24	22	25	26	24	23	24
männlich	kastriert	MW	397	397	402	394	389	391	398	410	422	432	437
		\pm STABW	18	18	18	11	16	28	35	38	39	40	46
männlich	intakt	MW	423	423	429	416	423	421	433	440	447	455	471
		\pm STABW	15	15	25	32	31	27	29	30	33	23	30

Tab. 05: Prä-, peri-, und postoperatives mittleres (\pm STABW) Körpergewicht in g der Kontrollgruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag										
Geschlecht	Hormonstatus		-1	0	1	2	3	4	6	8	10	12	14
weiblich	kastriert	MW	343	343	348	341	348	347	354	358	361	363	368
		\pm STABW	13	13	13	13	14	11	14	14	14	13	13
weiblich	intakt	MW	276	276	275	279	281	279	278	282	283	284	283
		\pm STABW	19	19	21	21	22	23	23	24	23	24	24
männlich	kastriert	MW	417	417	428	415	437	436	445	453	460	467	469
		\pm STABW	18	18	20	25	20	20	17	17	17	19	18
männlich	intakt	MW	421	421	412	411	430	447	454	463	469	476	478
		\pm STABW	32	32	42	34	46	34	35	33	33	34	35

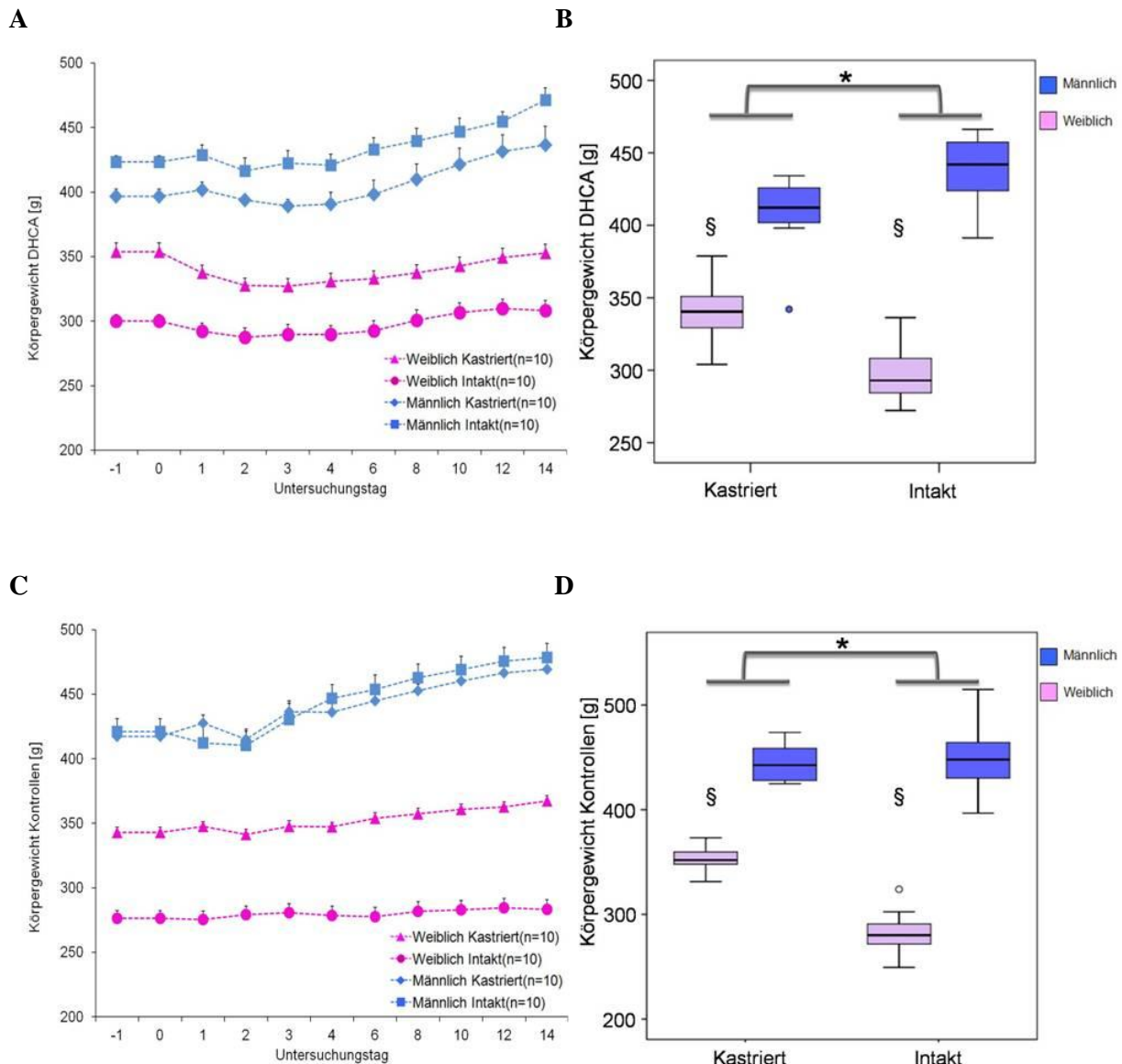


Abb. 21: Mittleres Körpergewicht in g (\pm STABW) der DHCA- Gruppen im zeitlichen Verlauf (A) und als Gesamtmittelwert über 14 Tage (B) sowie der Kontrollgruppen im zeitlichen Verlauf (C) und als Gesamtmittelwert über 14 Tage (D).

Abbildung A: Abgebildet sind die Werte der Baseline (Tag -1) und der Tage 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 nach EKZ mit 45 min DHCA. Ein signifikanter Einfluss der Zeit (Zeit^2 : $p \leq 0,001$) ist gegeben.

Abbildung B: Sowohl das Geschlecht ($\S = p \leq 0,001$ gg. Männlich) als auch der Hormonstatus ($* = p \leq 0,001$ Kastriert gg. Intakt) haben einen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere.

Abbildung C: Abgebildet sind die Werte der Baseline (Tag -1) und der Tage 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 und 14. Über den Verlauf zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Zeit (Zeit^2 : $p \leq 0,001$).

Abbildung D: Sowohl das Geschlecht ($\S = p \leq 0,001$ gg. Männlich) als auch der Hormonstatus ($* = p \leq 0,001$ Kastriert gg. Intakt) haben einen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere.

Darüber hinaus geht aus den Ergebnissen ein signifikanter Einfluss des operativen Eingriffs hervor ($p = 0,034$). Die Interaktionen Geschlecht \times OP ($p = 0,010$) und Hormonstatus \times OP ($p = 0,009$) haben einen signifikanten Einfluss. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus \times OP ($p = 0,690$) hat keinen Einfluss.

4.4 Tieraufälle und Tierersatz

Die Flowchart- Darstellungen (siehe Abb. 22 und 23) zeigen detailliert das Gruppendesign der DHCA- sowie der Kontrollgruppen, die relevanten Studienabschnitte, beginnend mit der Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Versuchstiere, über die Zuordnung zu den einzelnen Untersuchungsgruppen, hin zum operativen Eingriff, der Untersuchung der postoperativen Funktion und zur Untersuchung des morphologischen und biochemischen Outcomes, sowie die Anzahl der den einzelnen Versuchsabschnitten zugeordneten Ausfälle. 25 Tiere konnten nicht in die weitere Datenanalyse aufgenommen werden. Dieser zahlenmäßige Ausfall setzt sich wie folgt zusammen: 5 Tiere sind während des operativen Eingriffs, 1 Tier wegen Kanülierungsproblemen und 4 Tiere wegen ungenügendem venösem Rückfluss ausgefallen. 3 Tiere konnten wegen postoperativer Komplikationen nicht ausgewertet werden: 2 aufgrund einer Schwanznekrose, 1 Tier aufgrund einer Nahtdehiszenz. 18 Tiere überlebten die frühe postoperative Phase nicht: 13 weiblich intakte, 3 weiblich kastrierte und 2 männlich kastrierte Tiere. Bei zwei Tieren konnten die Laboruntersuchungen nicht vollständig durchgeführt werden (siehe Abb. 22).

Diese Ausfälle wurden durch neue Versuchstiere ersetzt, um eine Gruppengröße von $n = 10$ Tieren für die Untersuchung der neurokognitiven Defizite über 14 Tage nach DHCA zu erreichen.

Bei den Kontrolltieren gab es keine Ausfälle (siehe Abb. 23).

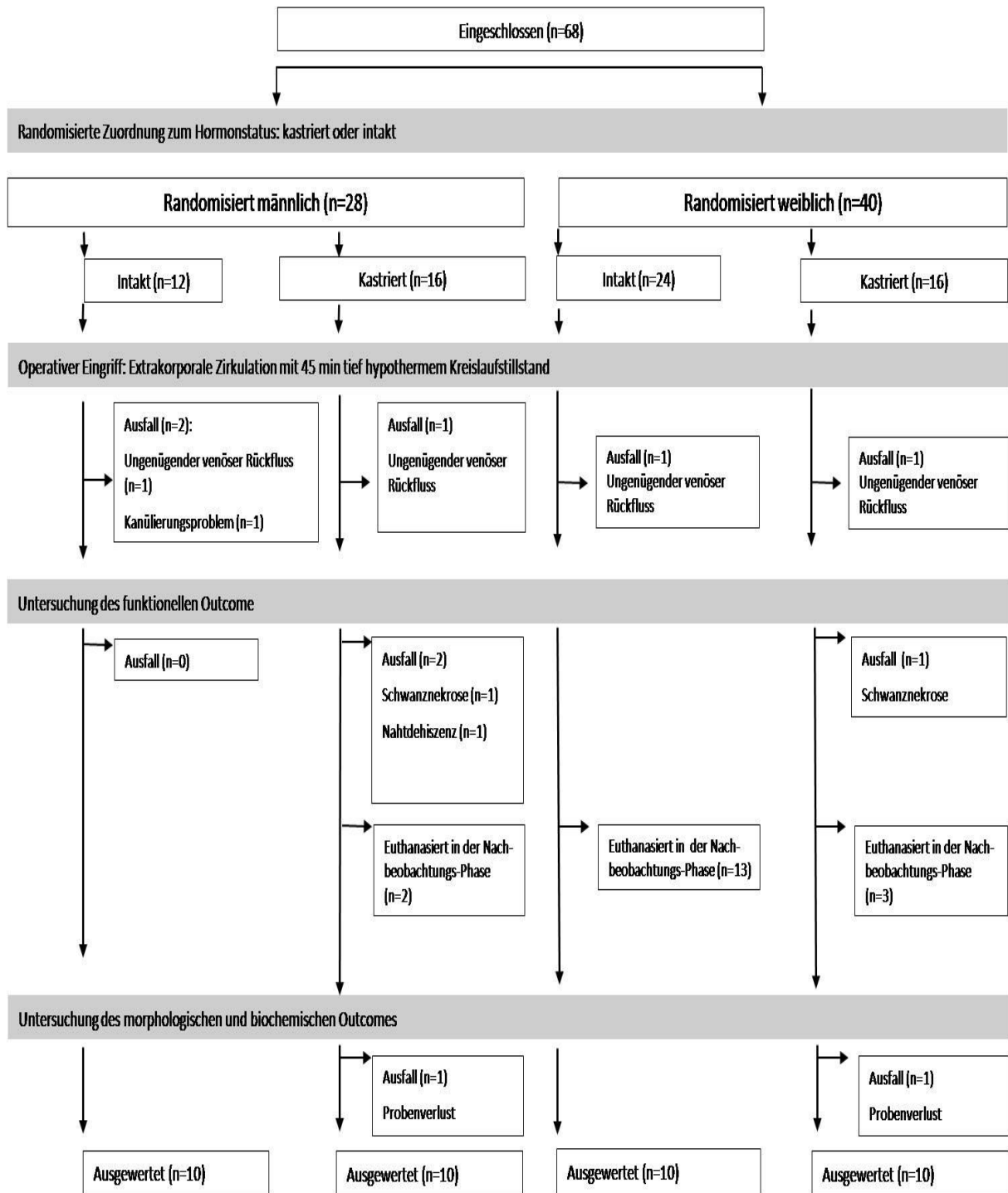


Abb. 22: Flowchart- Darstellung der Mortalität in der Gruppe der DHCA- Tiere.

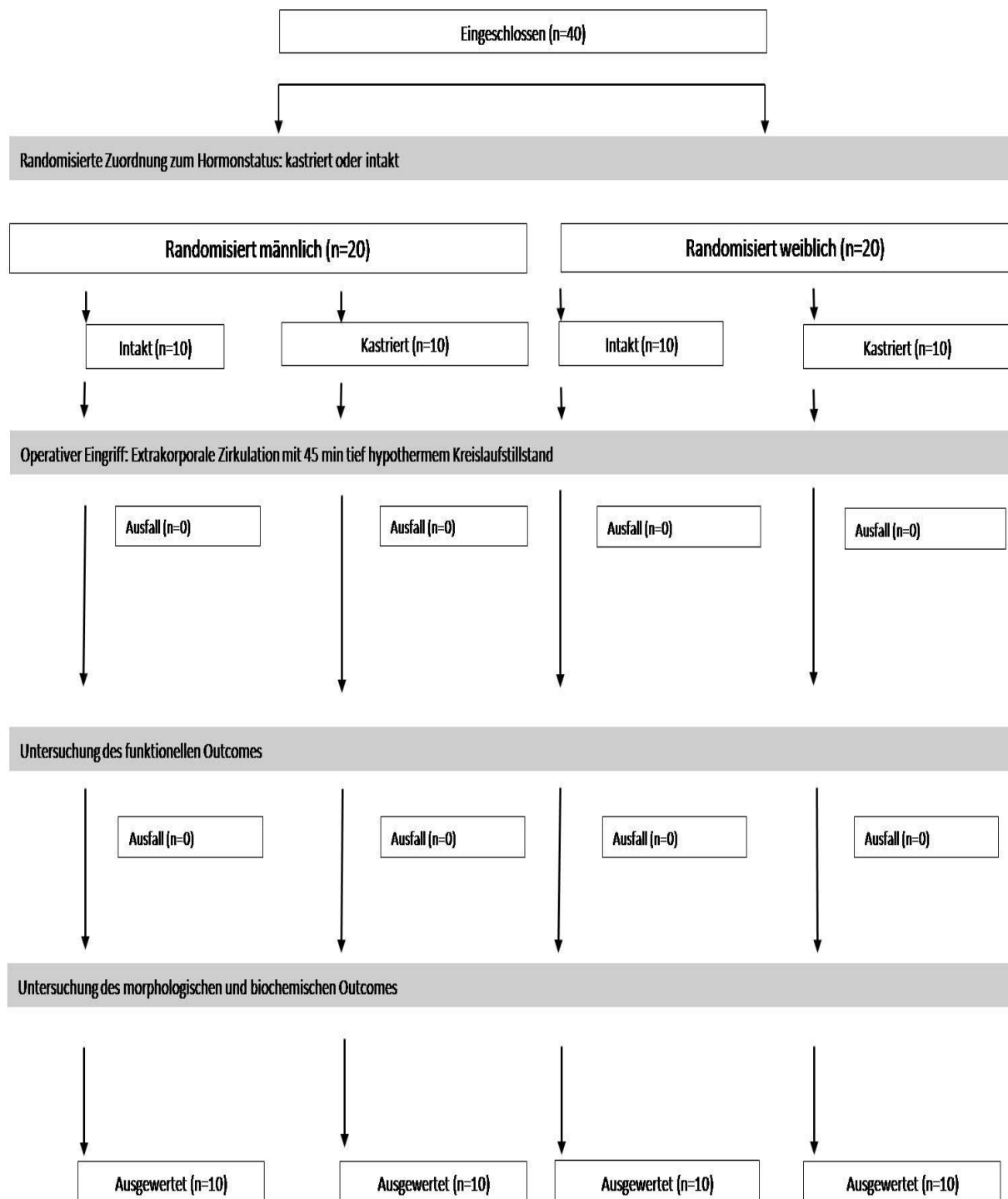


Abb. 23: Flowchart- Darstellung der Mortalität in der Gruppe der Kontrolltiere.

4.5 Neurologische Befunde

Zur Erfassung neurologischer bzw. motorischer Defizite werden die Versuchsgruppen prä- und postoperativ einer differenzierten neurologischen Untersuchung unterzogen (siehe Abschnitt 3.2.2.3). Die präoperativen Werte, erhoben an Tag -1, dienen als Basiswerte (sog. „Baseline“) zu den folgenden, postoperativ an Tag 1, 2, 3 und 14 erhobenen Werten.

4.5.1 Sensorik

Die Gesamtbeurteilung der Sensorik setzt sich aus den Punktebewertungen folgender, zur sensorischen Untersuchung gehörenden Parameter zusammen: Sehen, Hören, Vibrissenreaktion und Propriozeption (siehe Abschnitt 3.2.2.3.8). Ein Gesamtergebnis von 0 Punkten beschreibt eine uneingeschränkte sensorische Funktion, 12 Punkte bedeuten eine maximale beeinträchtigte Funktion (siehe Tab. 06). Die Ergebnisse über den Verlauf gesehen (siehe Abbildung 24 (A)) zeigen einen signifikanten Einfluss der Zeit (Zeit²: $p \leq 0,001$). Abbildung 24 (B) stellt den Gesamtmittelwert über den gesamten postoperativen Zeitraum dar. Hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar (Geschlecht: $p = 0,220$; Hormonstatus: $p = 0,057$).

Tab. 06: Mittleres (\pm STABW) Punktegesamtergebnis (Score) der Sensorikbeurteilung der DHCA- Gruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag				
Geschlecht	Hormonstatus		-1	1	2	3	14
weiblich	kastriert	MW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
weiblich	intakt	MW	0,0	2,7	1,7	1,3	0,7
		\pm STABW	0,0	3,4	3,0	2,6	2,1
männlich	kastriert	MW	0,0	1,4	1,3	1,3	0,4
		\pm STABW	0,0	1,9	2,1	2,4	1,2
männlich	intakt	MW	0,0	1,8	3,9	1,4	1,1
		\pm STABW	0,0	2,4	8,1	2,2	1,7

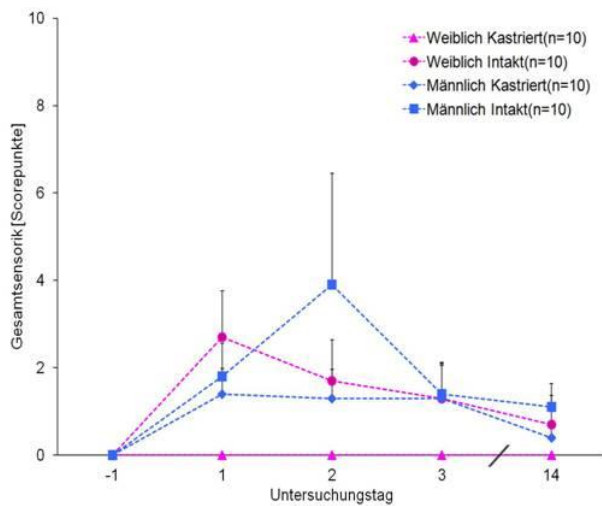
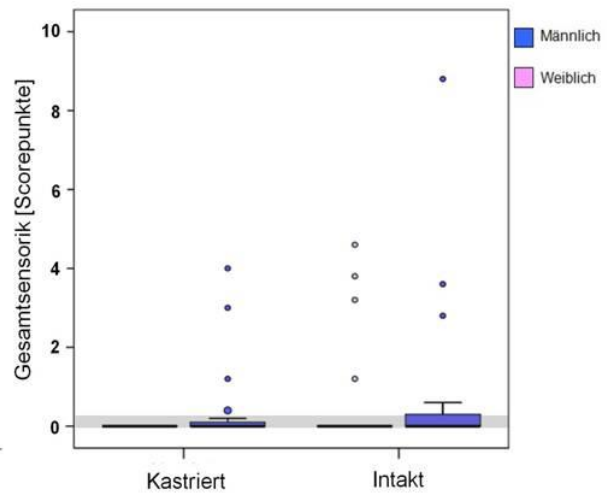
A**B**

Abb. 24: Mittleres (\pm STABW) Punktesamtergebnis der Sensorikbeurteilung: (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.

Abbildung A: Zeigt einen signifikanten Einfluss der Zeit (Zeit^2 : $p \leq 0.001$).

Abbildung B: Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Geschlecht: $p = 0,220$; Hormonstatus: $p = 0,057$) sind nicht gegeben. Auch die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus ($p = 0,770$) hat keinen signifikanten Einfluss.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.5.2 Laufen auf dem Balken („Beam Walking“)

Die Ergebnisse in Form der gemittelten Anzahl der Fehlritte zeigen, dass präoperativ nahezu alle Tiere diese Aufgabe fehlerfrei meistern können (siehe Tab. 07). Die Abbildung 25 (A) zeigt den Verlauf des Parameters über 14 Tage nach EKZ mit DHCA. Die Abbildung 25 (B) zeigt den Gesamtmittelwert über 14 Tage nach EKZ mit DHCA. Postoperativ (siehe Tab.07) machen alle Tiere im Vergleich zum präoperativen Ausgangswert (-1) über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen signifikant mehr Trittfehler beim Überqueren des Balkens (Zeit²: $p \leq 0,001$), jedoch ohne zwischen den Gruppen ein Signifikanzniveau zu erreichen (Geschlecht: $p = 0,919$; Hormonstatus: $p = 0,102$).

Tab. 07: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlritte beim Beam Walking- Test der DHCA-Gruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag				
Geschlecht	Hormonstatus		-1	1	2	3	14
weiblich	kastriert	MW	0,3	53,0	20,9	20,3	0,3
		\pm STABW	0,5	47,1	39,6	39,9	0,6
weiblich	intakt	MW	0,8	70,9	42,5	60,9	13,9
		\pm STABW	0,8	44,5	47,1	47,9	29,3
männlich	kastriert	MW	0,5	43,6	21,7	21,4	30,3
		\pm STABW	0,9	46,1	39,2	39,3	45,6
männlich	intakt	MW	1,0	70,7	41,8	31,5	30,9
		\pm STABW	1,3	44,8	47,6	44,9	45,3

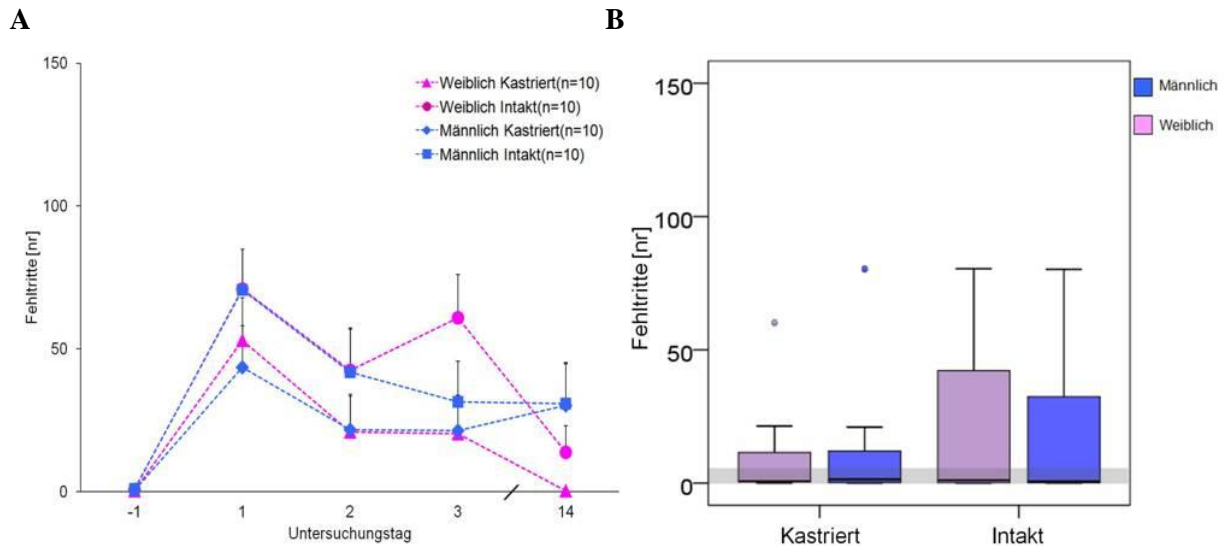


Abb. 25: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlritte beim Beam Walking- Test: (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.

Abbildung A: Alle Gruppen verschlechtern sich im Vergleich zum Ausgangswert signifikant nach dem Eingriff (Zeit: $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Geschlecht: $p = 0,919$; Hormonstatus: $p = 0,102$). Auch die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus ($p = 0,689$) hat keinen signifikanten Einfluss.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.5.3 Balken- Gleichgewichts- Test („Beam Balance“)

Die Ergebnisse (siehe Tab. 08) zeigen, dass präoperativ alle Tiere den Test fehlerfrei (nahezu unbeeinträchtigte Verweildauer von 60 s auf dem Balken) absolvieren können (-1). Die Abbildung 26 (A) zeigt den Verlauf des Parameters über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Die Abbildung 26 (B) zeigt den Gesamtmittelwert über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Alle Gruppen verschlechtern sich signifikant nach dem Eingriff (Zeit²: $p \leq 0,001$). Zwischen den einzelnen Gruppen sind postoperativ aber keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Geschlecht: $p = 0,396$; Hormonstatus: $p = 0,051$).

Tab. 08: Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam Balance- Test der DHCA- Gruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag				
Geschlecht	Hormonstatus		-1	1	2	3	14
weiblich	kastriert	MW	60,0	57,9	60,0	60,0	60,0
		\pm STABW	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0
weiblich	intakt	MW	60,0	27,9	31,5	39,4	56,6
		\pm STABW	0,0	27,1	25,2	26,4	10,1
männlich	kastriert	MW	58,6	38,9	48,4	48,3	48,2
		\pm STABW	4,1	23,7	23,2	23,4	19,8
männlich	intakt	MW	60,0	35,5	42,3	42,2	50,1
		\pm STABW	0,0	25,1	27,0	27,2	20,4

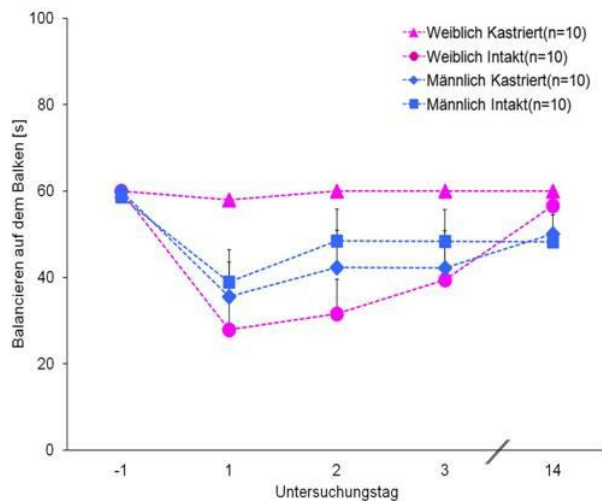
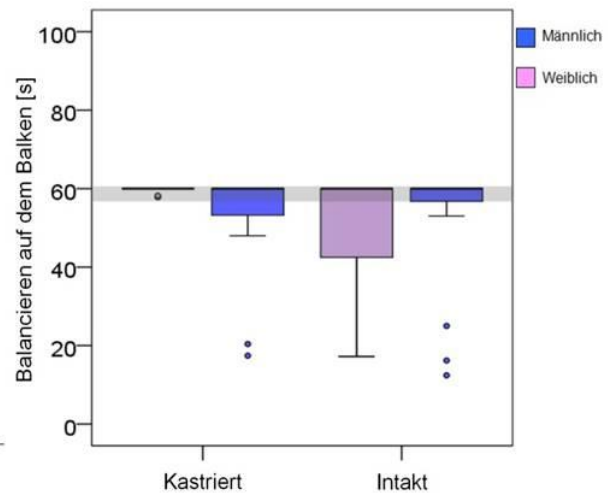
A**B**

Abb. 26: Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam Balance- Test: (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.

Abbildung A: Alle Gruppen verschlechtern sich signifikant nach DHCA (Zeit^2 : $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Geschlecht: $p = 0,396$; Hormonstatus: $p = 0,051$). Auch die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus ($p = 0,147$) hat keinen signifikanten Einfluss.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.5.4 Greif- Zug- Test („Prehensile Traction“)

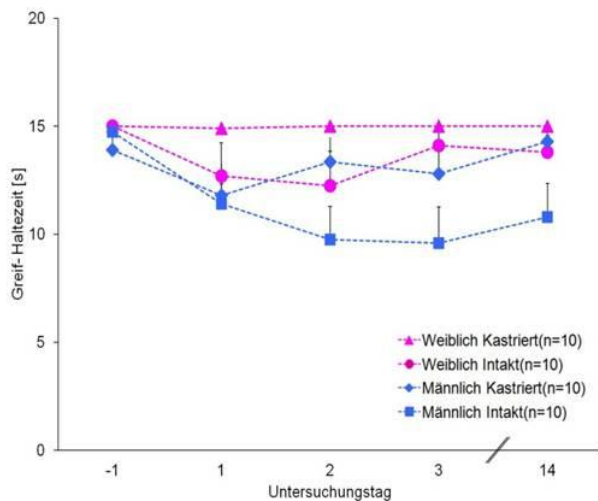
Die Ergebnisse (siehe Tab. 09) zeigen, dass präoperativ alle Tiere den Test nahezu fehlerfrei absolvieren können.

Die Abbildung 27 (**A**) zeigt den mittleren Verlauf der Greif- Haltezeit über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Die Abbildung 28 (**B**) zeigt den Gesamtmittelwert über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Alle Gruppen verschlechtern sich signifikant nach dem Eingriff (Zeit²: $p \leq 0,001$). Auch zwischen den einzelnen Gruppen sind postoperativ signifikante Unterschiede feststellbar (Geschlecht: $p = 0,008$; Hormonstatus: $p = 0,041$).

Tab. 09: Mittlere (\pm STABW) Greif- Haltezeit (s) beim Prehensile Traction- Test der DHCA- Gruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag				
Geschlecht	Hormonstatus		-1	1	2	3	14
weiblich	kastriert	MW	15,0	14,9	15,0	15,0	15,0
		\pm STABW	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
weiblich	intakt	MW	15,0	12,7	12,3	14,1	13,8
		\pm STABW	0,0	4,9	5,1	2,1	2,4
männlich	kastriert	MW	13,9	11,8	13,4	12,8	14,3
		\pm STABW	1,9	4,6	3,6	3,4	1,4
männlich	intakt	MW	14,8	11,4	9,8	9,6	10,8
		\pm STABW	0,8	2,9	4,9	5,3	4,9

A



B

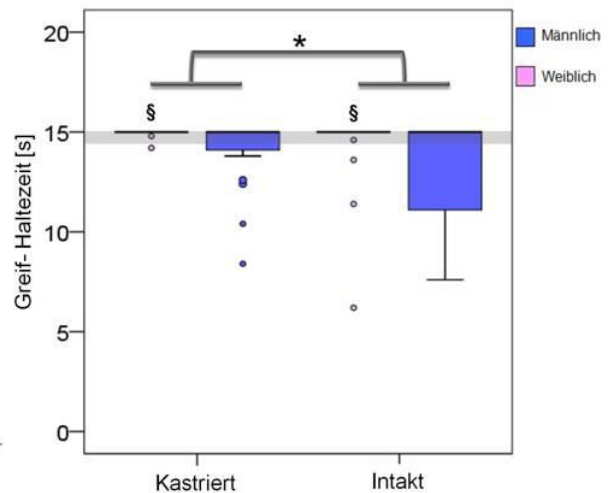


Abb. 27: Mittlere (\pm STABW) Greif- Haltezeit (s) beim Prehensile Traction- Test: (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.

Abbildung A: Alle Gruppen verschlechtern sich signifikant nach DHCA (Zeit^2 : $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt einen signifikanten Einfluss von Geschlecht und Hormonstatus (Geschlecht: $p = 0,008$; Hormonstatus: $p = 0,041$). Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus ($p = 0,776$) hat keinen signifikanten Einfluss auf das Greif- Haltevermögen am Drahtseil.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

($\$ = p < 0,05$ gg. Männlich, $* = p < 0,05$ gg. Intakt)

4.5.5 Gitter- Dreh- Test („Rotating Grid“)

Ebenfalls zur Beurteilung des Haltevermögens und der Greiffähigkeit auf einem um 180° rotierenden Drahtgitter dient der Rotating- Grid- Test. Die Ergebnisse (siehe Tab. 10) zeigen, dass präoperativ alle Tiere den Test nahezu fehlerfrei absolvieren können. Die Abbildung 28 (A) zeigt den Verlauf des Parameters über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Die Abbildung 28 (B) zeigt den Gesamtmittelwert über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Alle Gruppen verschlechtern sich signifikant nach dem Eingriff (Zeit²: $p \leq 0,001$). Geschlecht ($p = 0,097$) und auch der Hormonstatus ($p = 0,663$) haben keine signifikante Auswirkung auf die Ergebnisse.

Tab. 10: Mittlere (\pm STABW) Haltezeit (s) beim Rotating Grid- Test der DHCA- Gruppen

Tiergruppe			Untersuchungstag				
Geschlecht	Hormonstatus		-1	1	2	3	14
weiblich	kastriert	MW	4,7	5,0	4,9	5,0	4,8
		\pm STABW	0,4	0,0	0,3	0,0	0,6
weiblich	intakt	MW	4,9	4,5	4,9	4,9	4,9
		\pm STABW	0,3	1,5	0,3	0,5	0,3
männlich	kastriert	MW	4,7	4,9	4,7	4,5	4,3
		\pm STABW	0,6	0,3	0,3	0,7	1,2
männlich	intakt	MW	4,9	4,9	4,5	4,9	4,9
		\pm STABW	0,2	0,2	1,5	0,3	0,3

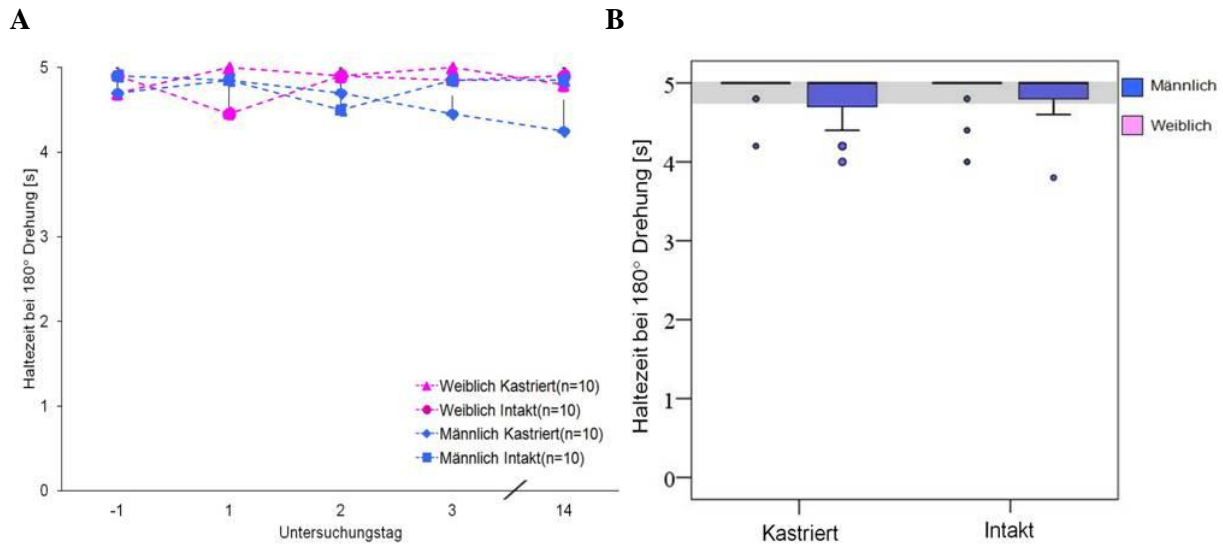


Abb. 28: Mittlere (\pm STABW) Haltezeit (s) beim Rotating Grid- Test: (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.

Abbildung A: Alle Gruppen verschlechtern sich signifikant nach DHCA (Zeit^2 : $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass Geschlecht ($p = 0,097$), Hormonstatus ($p = 0,663$) und auch die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus ($p = 0,985$) keinen signifikanten Einfluss auf das Greif- und Haltevermögen haben.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6 Befunde beim modifizierten Zylinder Hole Board Test (mZHBT)

4.6.1 Kognitive Parameter

4.6.1.1 Durchlaufgesamtzeit („Time Complete“)

Die Ergebnisse (siehe Tab. 11) zeigen, dass sich alle Tiere im Verlauf des Tests verbessern. Die Abbildung 29 (A) zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der mittleren Durchlaufgesamtzeit zwischen den Gruppen bestehen, was die gesamt-kognitive Leistung anbelangt. Alle vier Gruppen brauchen vergleichbar lange, um den Test erfolgreich zu erlernen und zu absolvieren (Zeit²: $p \leq 0,001$). In Abbildung 29 (B) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtmittelwert über 14 Tage beim Geschlecht ($p = 0,967$) und dem Hormonstatus ($p = 0,307$) zwischen den Gruppen.

Tab. 11: Mittlere (\pm STABW) Durchlaufgesamtzeit (s) beim mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	200	156	88	67	48	41	33	27	30	22
		\pm STABW	76	74	39	36	28	12	9	6	11	9
weiblich	intakt	MW	225	184	144	143	100	63	39	44	37	36
		\pm STABW	54	70	104	108	73	47	22	20	13	15
männlich	kastriert	MW	216	164	120	127	118	100	74	96	90	91
		\pm STABW	49	97	84	104	97	93	86	107	107	109
männlich	intakt	MW	157	90	56	50	43	41	28	26	32	22
		\pm STABW	56	41	27	21	20	13	9	11	15	7

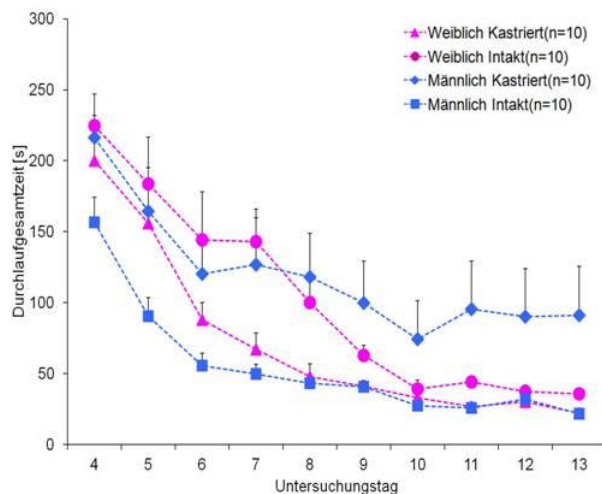
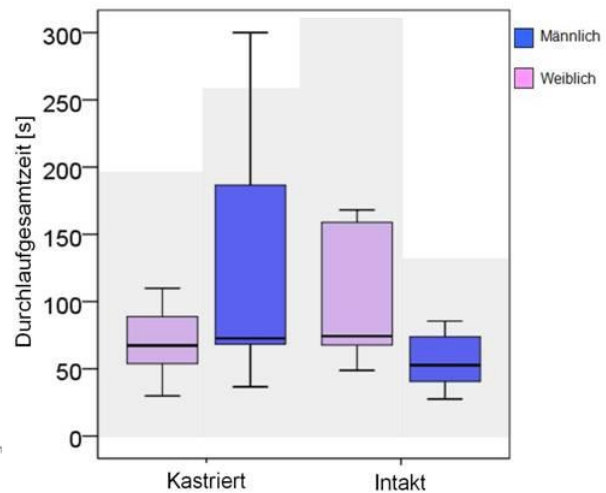
A**B**

Abb. 29: Mittlere (\pm STABW) Durchlaufgesamtzeit (s) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Alle Tiere verbessern sich signifikant im zeitlichen Verlauf (Zeit^2 : $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass Geschlecht ($p = 0,967$) und Hormonstatus ($p = 0,307$) jeweils für sich keinen Einfluss nehmen. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflusst die Durchlaufgesamtzeit signifikant ($p = 0,008$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.1.2 Fehlbesuche („Wrong choices“)

Die Auswertung der Daten (siehe Tab. 12) für die Häufigkeit von Besuchen an unmarkierten Zylindern (Fehlbesuche), welche als Parameter für das deklarative Gedächtnis dienen, zeigt in Abbildung 30 (**A**) keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der mittleren Anzahl der Fehlbesuche zwischen den Gruppen (Zeit²: $p \leq 0,001$). In Abbildung 30 (**B**) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Gesamtmittelwert über 14 Tage beim Geschlecht ($p = 0,454$) und dem Hormonstatus ($p = 0,212$).

Tab. 12: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlbesuche im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	3,7	3,0	2,4	1,7	1,5	1,9	0,8	0,9	0,9	0,7
		\pm STABW	2,1	1,5	1,8	1,4	1,5	1,4	0,7	0,6	1,1	0,8
weiblich	intakt	MW	4,3	4,7	3,6	2,7	2,4	2,5	1,3	1,7	1,1	0,9
		\pm STABW	2,6	2,9	1,4	2,1	1,7	1,4	1,5	0,7	0,7	0,9
männlich	kastriert	MW	5,6	3,5	3,5	2,3	2,1	2,1	1,3	1,2	1,0	0,8
		\pm STABW	3,6	2,8	2,5	1,5	2,2	1,6	1,4	0,9	1,1	1,0
männlich	intakt	MW	6,4	4,2	3,5	2,4	1,8	2,2	0,4	1,1	1,4	0,7
		\pm STABW	3,6	2,2	1,5	1,2	1,2	1,0	0,8	0,6	0,9	0,5

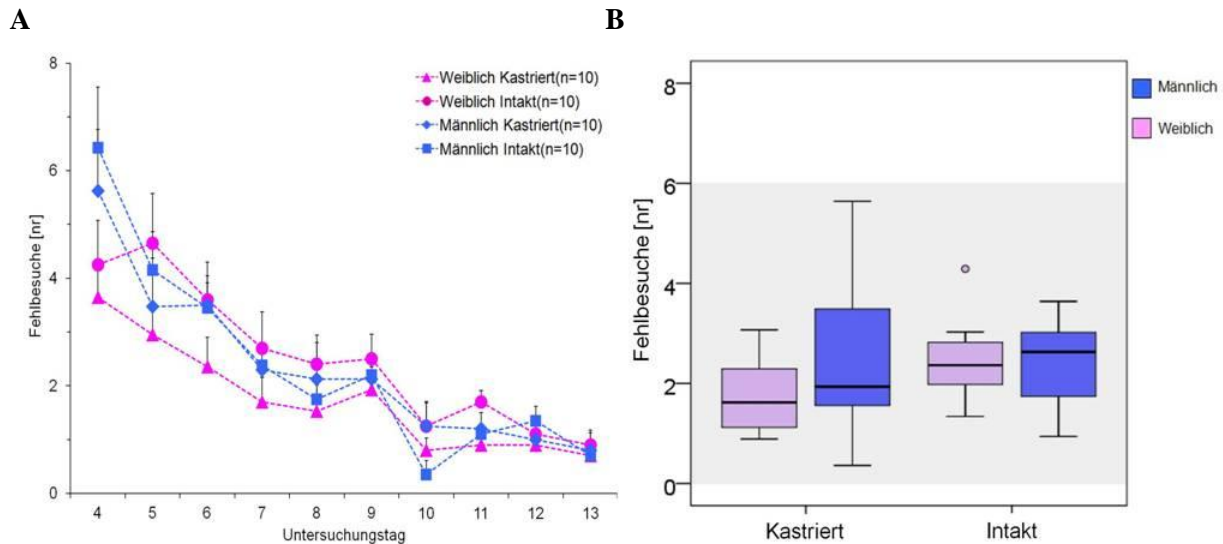


Abb. 30: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlbesuche im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Alle Tiere verbessern sich signifikant im zeitlichen Verlauf ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass Geschlecht ($p = 0,454$) und Hormonstatus ($p = 0,212$) keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflusst die Fehlbesuche ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,269$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.1.3 Auslassungsfehler („Omission errors“)

Dieser Parameter dient ebenfalls der Beurteilung der Leistungsfähigkeit des deklarativen Gedächtnisses und der Motivation der Tiere. Ausgewertet wird (siehe Tab. 13), wie viele markierte und mit einer Futterbelohnung präparierte Zylinder in den Testdurchläufen unbesucht bleiben (Auslassungsfehler). Die Auswertung des Lernverlaufs in Abbildung 31 **(A)** zeigt keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der mittleren Anzahl der Auslassungsfehler zwischen den Gruppen (Zeit²: $p = 0,004$). Die Abbildung 31 **(B)** zeigt, dass sowohl das Geschlecht ($p = 0,699$) als auch der Hormonstatus ($p = 0,359$) keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse im Gesamtmittelwert über 14 Tage haben.

Tab. 13: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Auslassungsfehler im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,9	0,6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
weiblich	intakt	MW	1,1	0,8	0,5	0,5	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,8	1,0	0,8	0,6	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
männlich	kastriert	MW	0,9	0,6	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,5	0,6	0,5
		\pm STABW	1,0	1,0	0,7	0,8	0,9	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0
männlich	intakt	MW	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

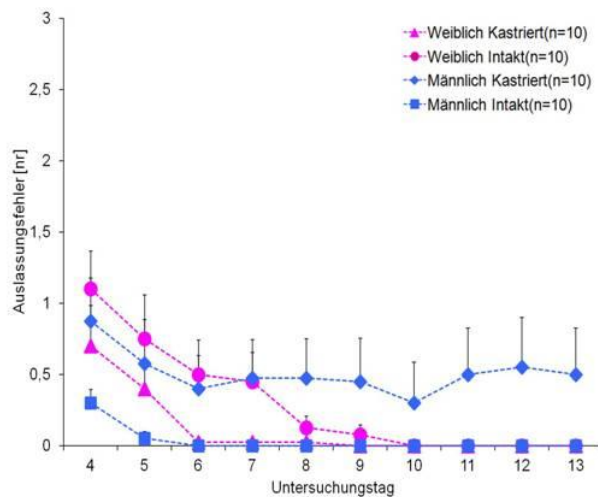
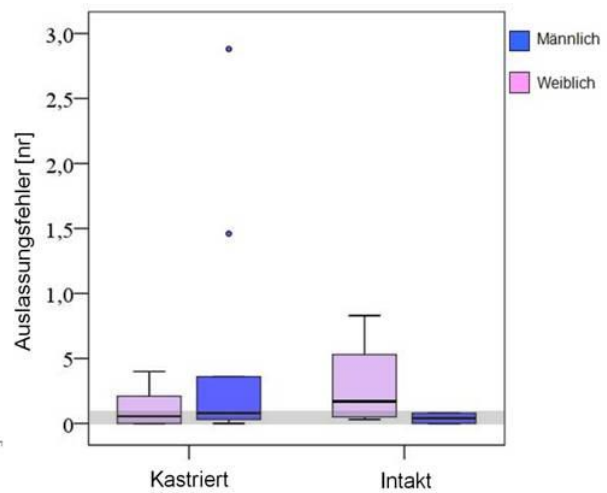
A**B**

Abb. 31: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Auslassungsfehler im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Alle Tiere verbessern sich signifikant (Zeit²: $p = 0,004$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass Geschlecht ($p = 0,699$) und Hormonstatus ($p = 0,359$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflusst die Auslassungsfehler signifikant ($p = 0,042$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.1.4 Wiederholungsfehler („Repeated choices“)

Das wiederholte Besuchen eines markierten Zylinders nach vorheriger, erfolgreicher Futteraufnahme (Wiederholungsfehler) gilt als Indikator für die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses. Ausgewertet wird, wie häufig dies geschieht (siehe Tab. 14). Abbildung 32 (A) zeigt im zeitlichen Verlauf der mittleren Anzahl der Wiederholungsfehler einen signifikanten Einfluss der Zeit (Zeit²: $p \leq 0,001$) ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Abbildung 32 (B) zeigt, dass hier das Geschlecht ($p = 0,598$) keinen signifikanten Einfluss im Gesamtmittelwert über 14 Tage hat. Die kastrierten Tiere beiderlei Geschlechts besuchen jedoch markierte, bereits geleerte Zylinder signifikant seltener als die intakten Tiere (Hormonstatus: * = $p = 0,022$).

Tab. 14: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Wiederholungsfehler im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	1,5	1,8	1,4	1,3	1,2	0,9	1,1	0,4	0,5	0,4
		\pm STABW	1,0	0,7	0,6	0,8	0,5	0,6	0,6	0,4	0,4	0,7
weiblich	intakt	MW	1,8	2,4	1,3	1,8	1,9	1,3	1,3	1,2	1,1	0,7
		\pm STABW	1,3	1,6	0,6	1,1	1,2	0,6	0,7	0,9	0,8	0,6
männlich	kastriert	MW	2,1	1,8	1,2	1,5	1,8	1,1	1,0	0,7	0,5	0,7
		\pm STABW	1,3	1,4	0,7	0,8	1,2	0,8	0,6	0,6	0,5	0,6
männlich	intakt	MW	2,2	2,2	1,6	2,1	1,6	1,2	1,0	0,9	0,8	0,7
		\pm STABW	0,7	0,8	0,8	0,7	1,0	0,6	0,9	0,6	0,6	0,8

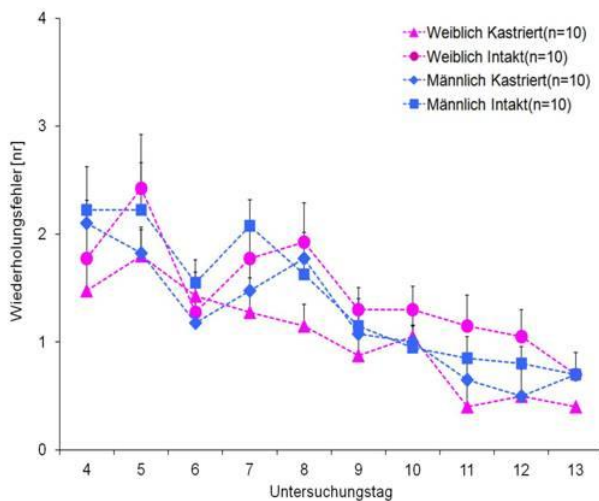
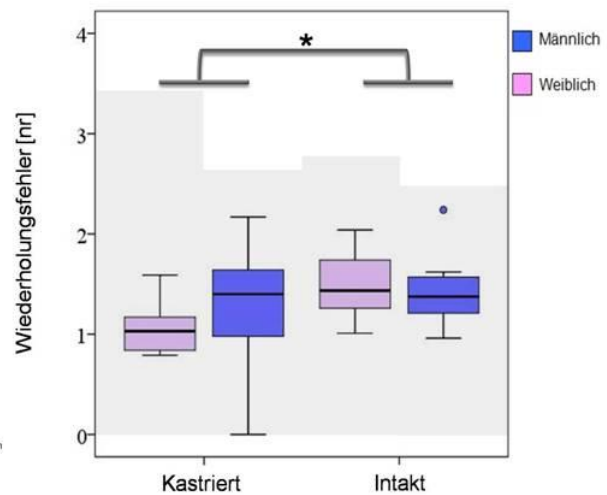
A**B**

Abb. 32: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Wiederholungsfehler im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Alle Tiere verbessern sich signifikant (Zeit²: $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,598$) und die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus ($p = 0,359$) die Wiederholungsfehler nicht signifikant beeinflussen. Der Hormonstatus (* = $p = 0,022$) hat einen signifikanten Einfluss auf die Wiederholungsfehler.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.2 Motorische Parameter

4.6.2.1 Fresszeit („Time per food intake“)

Der Parameter Time per food intake (Fresszeit) dient der Beurteilung der Geschicklichkeit der Tiere. Ausgewertet wird die Zeit (s) welche die Tiere dafür benötigen. Demnach haben die weiblichen Tiere eine deutlich längere Fresszeit als die männlichen Tiere. (siehe Tab. 15). Die Abbildung 33 (A) zeigt, dass im zeitlichen Verlauf der mittleren Fresszeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen, alle Tiere brauchen über den Verlauf gesehen immer weniger Zeit um die Futterbelohnungen zu fressen (Zeit²: $p \leq 0,001$). Die Abbildung 33 (B) zeigt signifikante Unterschiede im Gesamtmittelwert über 14 Tage zwischen den Gruppen in Bezug auf das Geschlecht (* = $p \leq 0,001$), nicht jedoch in Bezug auf den Hormonstatus ($p = 0,331$).

Tab. 15: Mittlere (\pm STABW) Fresszeit (s) im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	5,6	5,5	4,4	4,3	3,6	3,3	2,8	2,3	2,1	2,0
		\pm STABW	1,7	2,4	2,4	3,4	1,2	1,1	1,1	0,8	0,5	0,9
weiblich	intakt	MW	4,3	4,3	5,4	6,0	4,9	3,4	2,8	3,0	3,5	3,5
		\pm STABW	1,4	1,2	4,4	3,8	3,4	1,8	1,1	1,1	1,7	1,9
männlich	kastriert	MW	3,5	2,8	2,3	2,3	1,9	2,6	2,0	2,0	1,6	1,5
		\pm STABW	1,1	1,1	0,9	0,9	0,8	2,0	0,7	0,9	1,3	0,6
männlich	intakt	MW	3,1	2,6	2,3	2,2	2,2	2,9	2,8	2,4	2,5	2,5
		\pm STABW	0,9	1,1	1,1	0,7	0,8	1,7	1,2	1,2	1,4	1,5

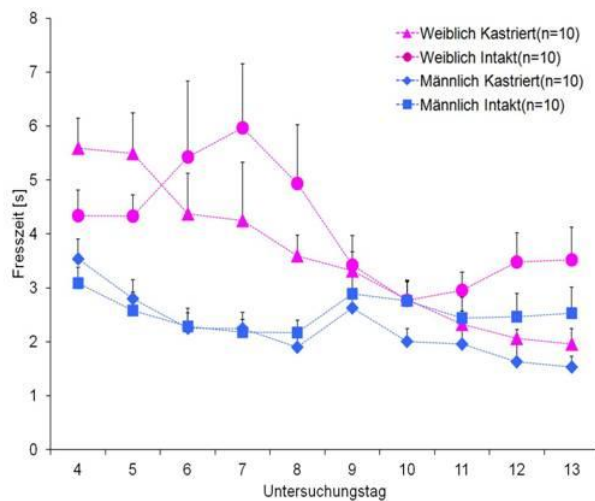
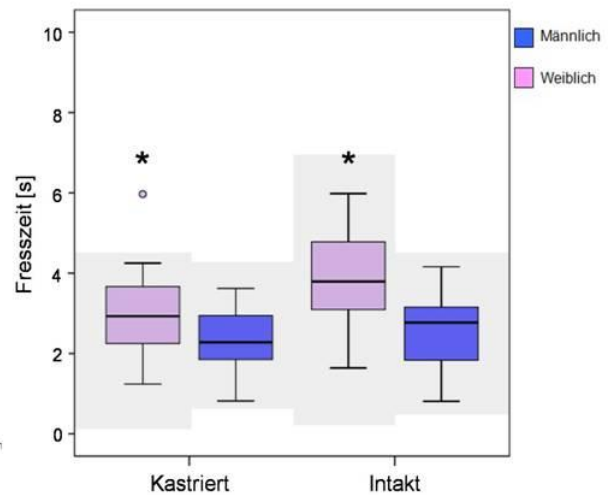
A**B**

Abb. 33: Mittlere (\pm STABW) Fresszeit (s) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Alle Tiere verbessern sich signifikant ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass das Geschlecht ($* = p \leq 0,001$) die Fresszeit signifikant beeinflusst, der Hormonstatus ($p = 0,331$) und die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflussen die Fresszeit nicht signifikant ($p = 0,725$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.2.2 Frustrane Lochbesuche („Frustrane hole visits“)

Dieser Parameter erfasst die Zahl der Besuche eines markierten und mit einer Futterbelohnung bestückten Zylinders, wobei jedoch die Futterbelohnung nicht entnommen und gefressen wird oder werden kann. Er wird zur Beurteilung der feinmotorischen Geschicklichkeit der Tiere herangezogen. Ausgewertet wird deren Anzahl (siehe [Tab 16](#)). Die Abbildung 34 (A) zeigt im zeitlichen Verlauf keine signifikante Verschlechterung der Tiere nach dem Eingriff (Zeit²: $p = 0,70$). Die Abbildung 34 (B) zeigt, dass im Gesamtmittelwert über 14 Tage weder das Geschlecht ($p = 0,489$) noch der Hormonstatus ($p = 0,352$) einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der frustranen Lochbesuche haben.

Tab. 16: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der frustranen Lochbesuche im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
		\pm STABW	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0
weiblich	intakt	MW	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,1	0,3	0,2	0,4	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
männlich	kastriert	MW	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
		\pm STABW	0,2	0,3	0,3	0,3	0,0	0,1	0,1	0,3	0,0	0,1
männlich	intakt	MW	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0

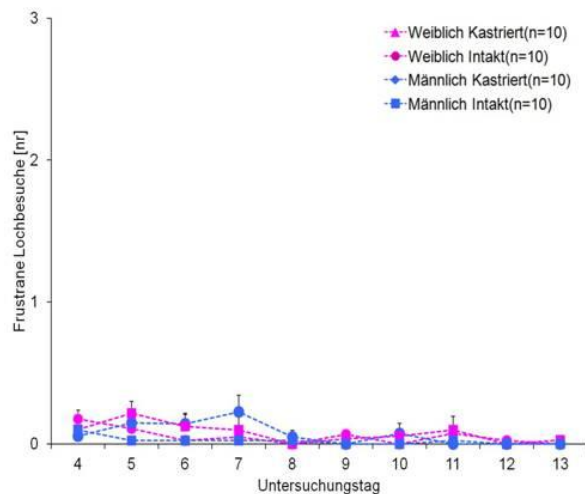
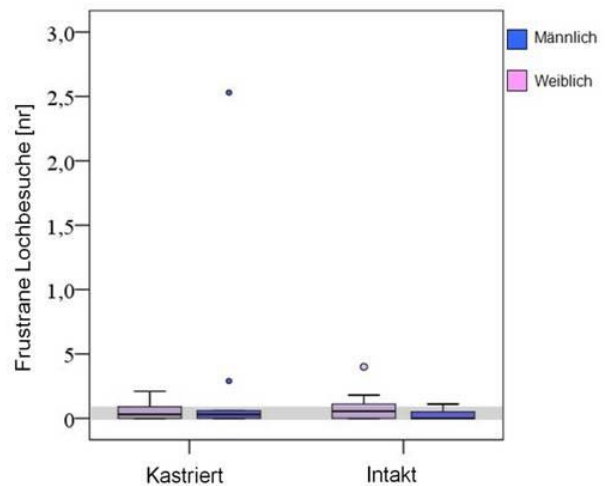
A**B**

Abb. 34: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der frustranen Lochbesuche im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit keinen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere verschlechtern sich nicht signifikant (Zeit²: $p = 0,70$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,489$) und der Hormonstatus ($p = 0,352$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Auch die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die frustranen Lochbesuche nicht signifikant ($p = 0,228$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3 Verhaltensparameter

4.6.3.1 Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch („Latency first entry board“)

Die Zeit, welche vergeht, bis ein Versuchstier sich zum ersten Mal gerichtet auf das Board wagt (Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch) (siehe Tab. 17), gilt als Indikator für Angstverhalten. Aus Abbildung 35 (**A**) geht hervor, dass es im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gibt. Die Tiere verbessern sich signifikant über die Zeit (Zeit²: $p = 0,002$). Die Abbildung 35 (**B**) zeigt, dass im Gesamtmittelwert über 14 Tage Geschlecht ($p = 0,506$) und Hormonstatus ($p = 0,254$) ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch haben.

Tab. 17: Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Boardbesuch im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	33,0	24,2	9,8	3,8	2,5	2,4	1,3	1,5	1,4	2,1
		\pm STABW	48,2	40,2	10,0	2,9	1,9	1,3	0,3	0,3	0,4	1,0
weiblich	intakt	MW	38,9	45,1	34,5	20,4	4,4	3,0	2,6	2,1	2,0	2,1
		\pm STABW	54,3	65,8	44,7	41,9	4,3	1,2	2,3	1,0	1,0	0,9
männlich	kastriert	MW	43,1	42,2	23,5	27,7	25,7	25,6	30,5	26,5	32,6	36,1
		\pm STABW	58,0	77,8	37,6	48,7	50,2	46,9	58,9	46,5	59,7	70,9
männlich	intakt	MW	12,3	8,8	4,2	3,4	2,1	2,0	1,4	1,6	2,3	1,6
		\pm STABW	9,7	8,7	3,7	3,1	1,0	0,8	0,5	0,5	2,4	0,8

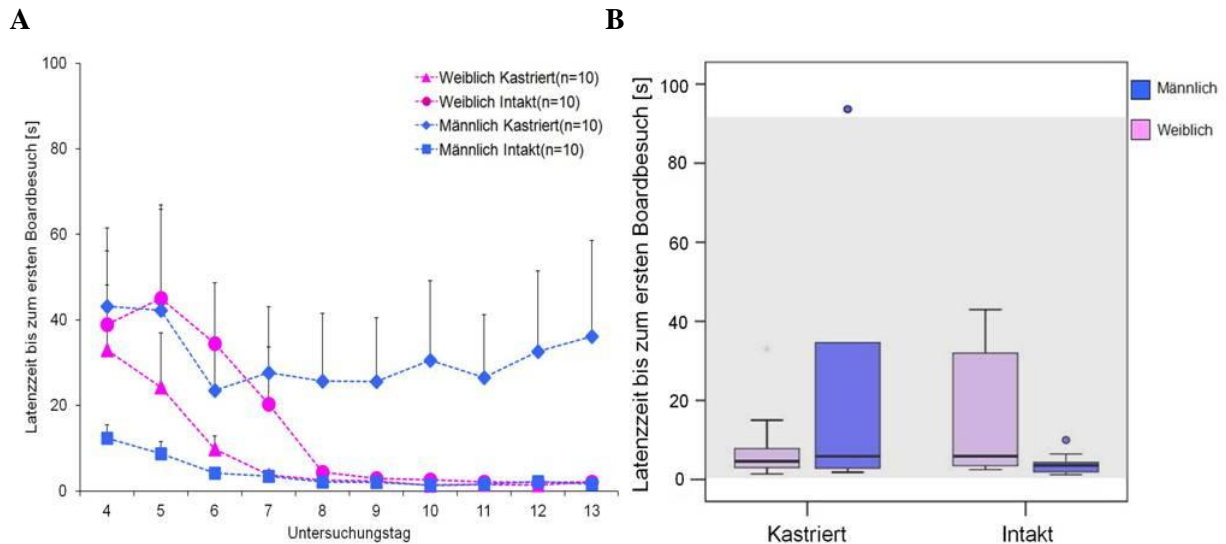


Abb. 35: Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Boardbesuch im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Alle Tiere verbessern sich signifikant (Zeit²: $p = 0,002$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,506$) und der Hormonstatus ($p = 0,254$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,053$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.2 Latenzzeit zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders („Latency visit first baited hole“)

Die Zeit, die das Tier benötigt, bis es zum ersten markierten und mit einer Futterbelohnung befüllten Zylinder geht (Latenzzeit zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders) (siehe [Tab. 18](#)) ist ein Indikator für gerichtete Exploration und Neugier. Hierbei zeigt sich bei der Auswertung der Ergebnisse in Abbildung 36 (**A**) dass es im zeitlichen Verlauf zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede gibt. Alle Tiere verbessern sich signifikant über die Zeit (Zeit²: $p \leq 0,001$). Die Abbildung 36 (**B**) zeigt im Gesamtmittelwert über 14 Tage keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,573$) und Hormonstatus ($p = 0,292$).

Tab. 18: Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	85,6	35,2	20,0	5,5	2,9	8,1	2,0	3,6	3,3	4,0
		\pm STABW	62,0	43,0	19,3	3,5	1,1	3,3	0,4	1,6	1,2	1,8
weiblich	intakt	MW	122,5	75,8	51,6	39,4	6,9	11,0	3,3	5,2	4,4	14,0
		\pm STABW	78,8	88,0	59,7	51,0	5,6	8,5	2,4	2,4	1,3	29,7
männlich	kastriert	MW	117,6	80,8	50,6	40,6	45,0	44,7	41,7	42,1	53,9	45,8
		\pm STABW	85,3	88,7	65,7	71,0	91,6	86,4	88,7	75,4	97,5	89,9
männlich	intakt	MW	43,4	15,8	9,6	5,1	2,9	8,5	1,9	4,3	4,5	4,1
		\pm STABW	20,4	9,2	6,7	3,2	1,2	3,4	0,6	3,2	2,9	2,0

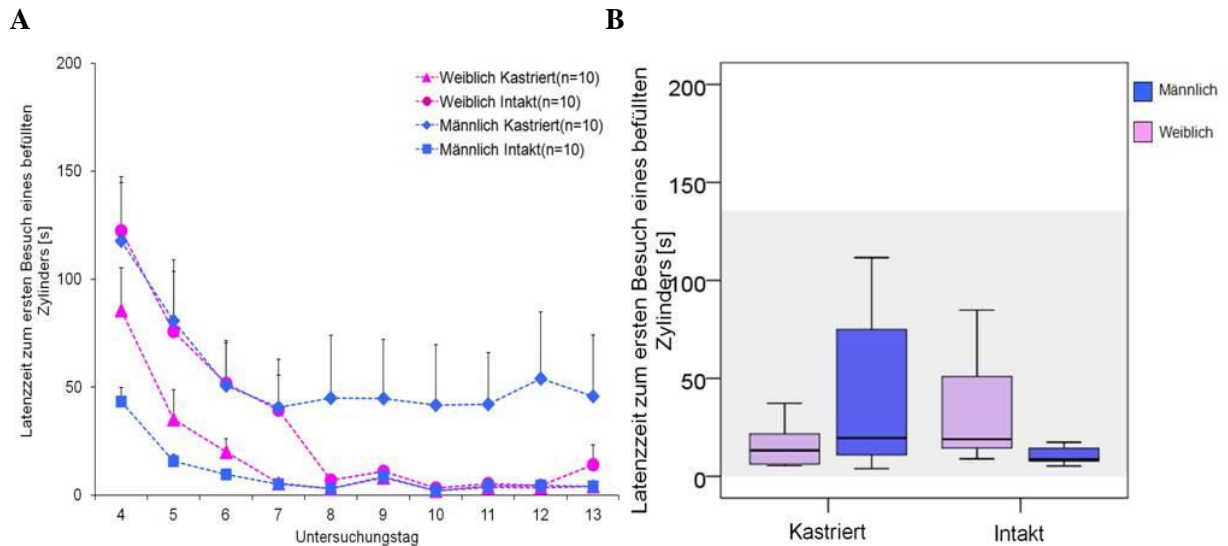


Abb. 36: Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere verbessern sich insgesamt signifikant (Zeit²: $p \leq 0,001$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,573$) und der Hormonstatus ($p = 0,292$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die Latenzzeit zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders signifikant ($p = 0,031$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.3 Auf dem Board verbrachte Zeit („Time on Board“)

Der relative, prozentual an der Gesamtzeit bemessene Anteil der, auf dem Board verbrachten Gesamtzeit stellt wiederum einen Indikator für Angstverhalten dar. Ratten als agora- und neophobe Tiere meiden offene Flächen und sind Neuem gegenüber äußerst misstrauisch. Die intakten Tiere beider Geschlechter verbringen signifikant mehr Zeit auf dem Board (siehe Tab. 19). Bei der Auswertung der Daten zeigt sich in Abbildung 37 (A), dass es im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gibt. Alle Tiere verweilen über die Zeit insgesamt signifikant länger auf dem Board ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$). Aus Abbildung 37 (B) gehen im Gesamtmittelwert über 14 Tage keine signifikanten Unterschiede bei den Ergebnissen im Hinblick auf das Geschlecht ($p = 0,798$), wohl aber in Bezug auf den Hormonstatus ($* = p = 0,045$) hervor.

Tab. 19: Mittlere (\pm STABW) auf dem Board verbrachte Zeit (%) im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	37,4	43,8	50,5	53,9	64,0	66,8	71,6	71,9	64,2	66,2
		\pm STABW	18,5	22,9	21,5	21,6	12,3	12,9	10,1	13,0	13,8	8,9
weiblich	intakt	MW	41,7	47,6	54,6	57,0	59,4	64,8	69,6	67,6	69,2	72,4
		\pm STABW	21,8	27,5	26,9	25,5	17,3	16,6	15,1	17,3	11,7	18,3
männlich	kastriert	MW	40,8	43,9	50,0	49,9	52,4	53,1	56,1	53,7	48,5	60,3
		\pm STABW	16,7	23,5	21,6	29,5	23,2	26,7	23,8	25,8	25,8	23,4
männlich	intakt	MW	54,8	61,0	64,0	67,6	70,6	74,8	79,0	83,3	75,1	82,2
		\pm STABW	14,3	18,1	15,6	10,2	8,6	11,0	11,5	9,1	8,1	11,4

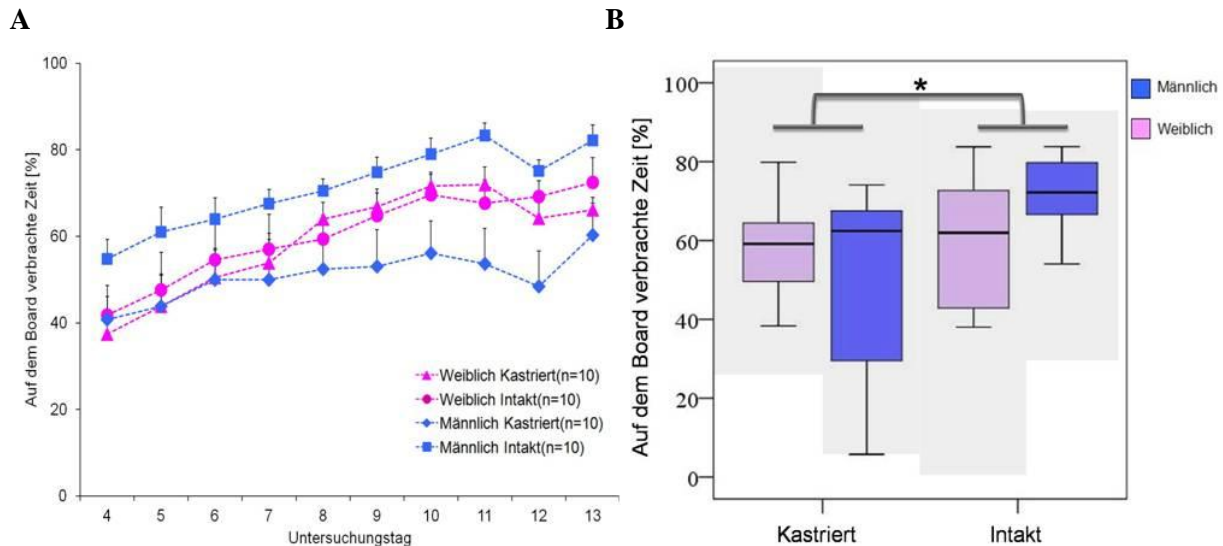


Abb. 37: Mittlere (\pm STABW) auf dem Board verbrachte Zeit (%) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere verbringen im Verlauf insgesamt signifikant mehr Zeit auf dem Board ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,798$) und die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus ($p = 0,079$) die auf dem Board verbrachte Zeit nicht signifikant beeinflussen. Der Hormonstatus (* = $p = 0,045$) hat einen signifikanten Einfluss.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.4 Immobilität („Immobility“)

Die Dauer der Inaktivitätsphasen (Immobilität) in der Gesamtzeit eines Durchlaufs (siehe Tab. 20) ist ein weiterer Parameter zur Beurteilung des Allgemeinbefindens.

Die Abbildung 38 (A) zeigt, dass die Zeit im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Einfluss auf die Inaktivitätsphasen hat. Die Tiere haben über die Zeit signifikant kürzere Inaktivitätsphasen ($\text{Zeit}^2: p = 0,016$). Die Abbildung 38 (B) zeigt, dass es im Gesamtmittelwert über 14 Tage zwischen den Gruppen im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,709$) und Hormonstatus ($p = 0,797$) keine signifikanten Unterschiede gibt.

Tab. 20: Mittlere (\pm STABW) Immobilität (s) im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	1,7	7,5	0,2	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	3,6	10,7	0,7	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
weiblich	intakt	MW	7,0	10,4	6,4	5,7	3,2	2,5	0,7	0,6	0,4	0,0
		\pm STABW	10,2	22,0	10,6	13,3	6,0	7,6	2,1	1,4	1,1	0,0
männlich	kastriert	MW	4,3	5,8	1,8	1,9	2,4	3,2	3,5	1,5	5,6	5,0
		\pm STABW	10,2	12,9	5,3	5,4	5,1	7,1	8,3	4,1	15,8	12,8
männlich	intakt	MW	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

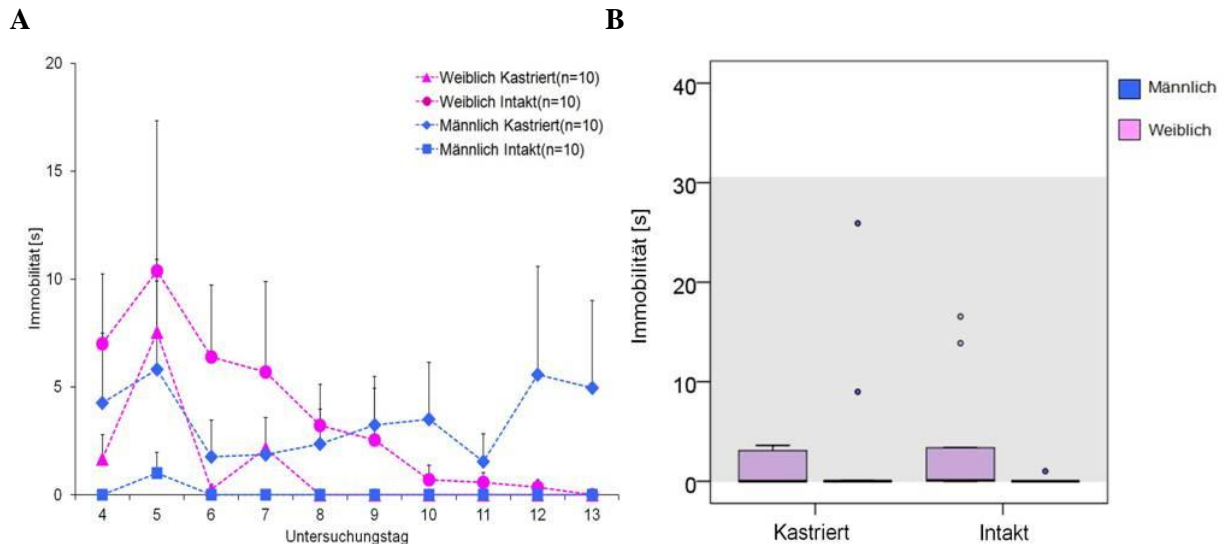


Abb. 38: Mittlere (\pm STABW) Immobilität (s) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere haben insgesamt signifikant weniger Immobilitätsphasen (Zeit^2 : $p = 0,016$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,709$) und der Hormonstatus ($p = 0,797$) jeweils für sich haben keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die Immobilität ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,084$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.5 Besuche befüllter Zylinder („Number of visits baited hole“)

Die Anzahl der Besuche markierter und befüllter Zylinder (Besuche befüllter Zylinder) (siehe Tab. 21) gilt ebenfalls als Indikator für gerichtete Exploration und Neugier.

Aus Abbildung 39 (**A**) geht hervor, dass die Zeit im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere verbessern sich insgesamt (Zeit²: $p \leq 0,001$). Die Abbildung 39 (**B**) zeigt, dass es im Gesamtmittelwert über 14 Tage zwischen den Gruppen im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,726$) und Hormonstatus ($p = 0,460$) keine signifikanten Unterschiede gibt.

Tab. 21: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Besuche befüllter Zylinder im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	2,4	2,7	3,0	3,0	3,0	3,1	3,0	3,1	3,0	3,0
		\pm STABW	0,8	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0
weiblich	intakt	MW	2,0	2,4	2,6	2,7	2,9	2,9	3,1	3,0	3,0	3,0
		\pm STABW	0,8	0,9	0,7	0,6	0,3	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
männlich	kastriert	MW	2,4	2,7	2,7	2,5	2,6	2,6	2,7	2,6	2,5	2,6
		\pm STABW	0,9	0,9	0,8	0,8	0,9	1,0	0,9	0,9	1,1	0,9
männlich	intakt	MW	2,8	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
		\pm STABW	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0

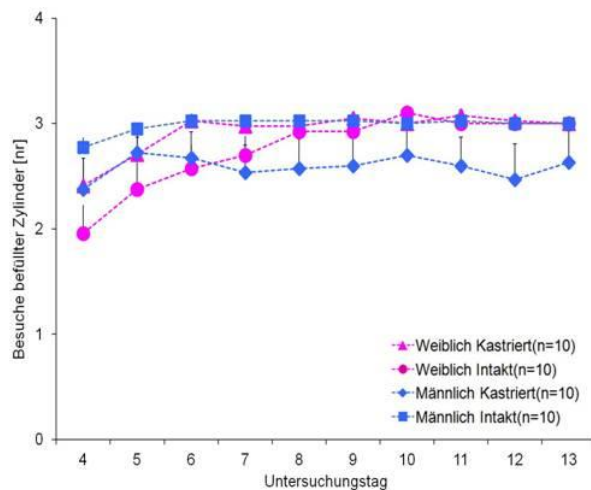
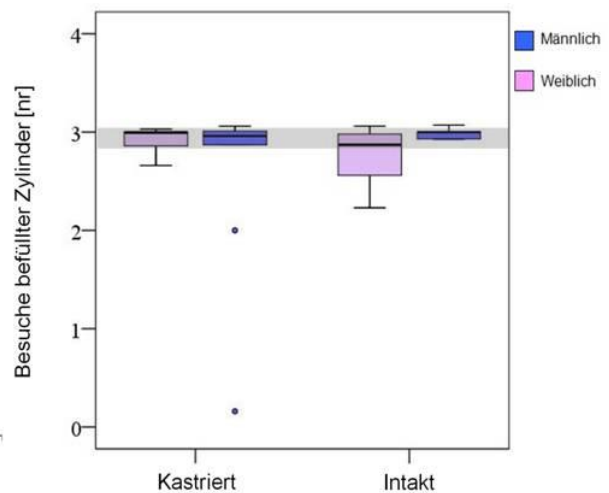
A**B**

Abb. 39: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Besuche befüllter Zylinder im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere besuchen im Verlauf mehr befüllte Zylinder (Zeit: $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,726$) und der Hormonstatus ($p = 0,460$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die Besuche befüllter Zylinder ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,075$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.6 Boardbesuche („Number of board entries“)

Die Anzahl der Boardbesuche (siehe Tab. 22) lässt ebenso Rückschlüsse auf das Angstverhalten zu. Aus der Abbildung 40 (**A**) geht hervor, dass im zeitlichen Verlauf die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere betreten das Board insgesamt seltener (Zeit^2 : $p \leq 0,001$). Die Abbildung 40 (**B**) zeigt keine signifikanten Unterschiede bei den Ergebnissen im Gesamtmittelwert über 14 Tage im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,992$) und Hormonstatus ($p = 0,327$).

Tab. 22: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Boardbesuche im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	6,0	5,3	4,8	4,1	3,9	3,7	3,9	3,0	3,5	2,8
		\pm STABW	2,0	2,0	2,2	1,3	1,7	1,4	1,8	1,2	0,9	0,8
weiblich	intakt	MW	6,2	5,4	4,1	4,4	4,7	3,7	3,1	3,9	3,7	2,6
		\pm STABW	2,6	2,6	1,0	1,8	2,3	1,1	1,4	2,1	1,1	1,1
männlich	kastriert	MW	7,7	6,4	5,4	4,4	5,0	3,7	3,1	3,5	3,6	3,4
		\pm STABW	2,4	3,1	2,2	1,8	2,8	1,4	1,1	2,4	1,4	2,1
männlich	intakt	MW	7,4	4,8	4,6	4,1	3,5	3,2	2,5	2,2	2,8	1,9
		\pm STABW	2,2	2,3	2,0	0,9	1,4	1,1	1,3	0,9	0,8	0,6

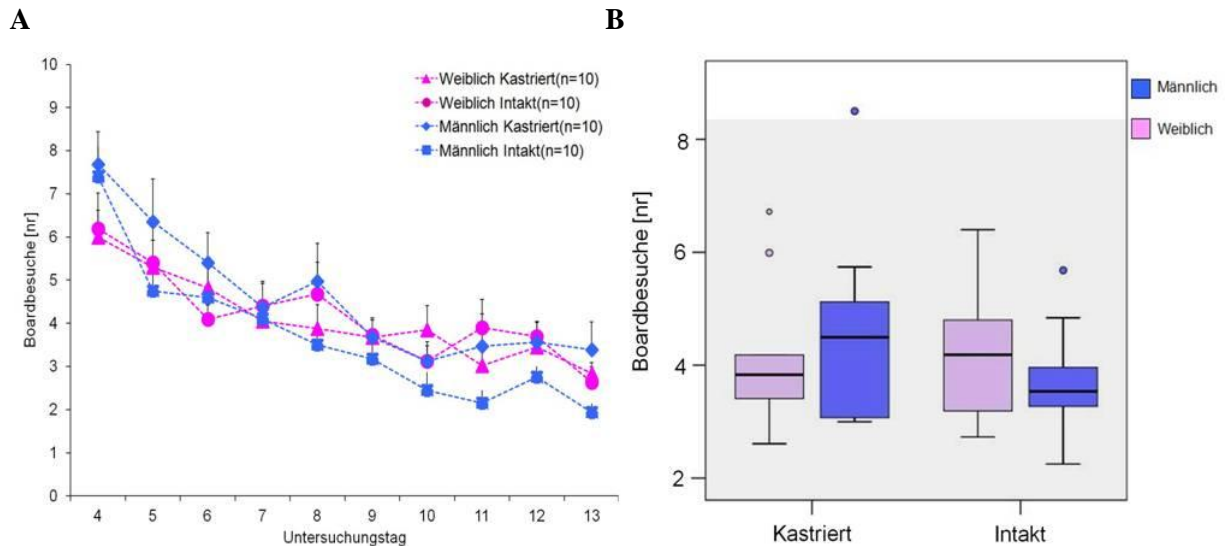


Abb. 40: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Boardbesuche im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung **A**: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere betreten das Board insgesamt seltener ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$).

Abbildung **B**: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,992$) und der Hormonstatus ($p = 0,327$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die Boardbesuche ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,234$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.7 Gruppenkontakte („Group contact“)

Die Häufigkeit der Kontaktaufnahme des Versuchstieres mit seinen Artgenossen durch die Löcher der Trennwand (Gruppenkontakte) (siehe Tab. 23) gibt Aufschluss über die soziale Affinität.

Aus Abbildung 41 (**A**) geht hervor, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat (Zeit²: $p \leq 0,001$). Die Tiere haben im zeitlichen Verlauf weniger Gruppenkontakte. Die Abbildung 41 (**B**) zeigt, dass es im Gesamtmittelwert über 14 Tage zwischen den Gruppen im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,406$) und Hormonstatus ($p = 0,126$) keine signifikanten Unterschiede gibt.

Tab. 23: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Gruppenkontakte im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	3,2	1,6	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,4	1,1	0,6
		\pm STABW	2,8	1,7	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,5	2,4	0,7
weiblich	intakt	MW	3,6	1,9	2,1	1,9	0,9	0,4	0,6	0,6	0,4	0,5
		\pm STABW	3,3	1,8	2,6	2,3	0,8	0,4	0,7	0,5	0,4	0,6
männlich	kastriert	MW	2,2	3,1	3,7	3,9	3,6	2,8	2,1	2,6	2,1	2,4
		\pm STABW	1,8	2,9	4,6	7,1	4,5	3,8	3,4	4,8	3,5	4,8
männlich	intakt	MW	1,8	1,5	0,8	0,6	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
		\pm STABW	3,2	2,0	0,9	1,0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3

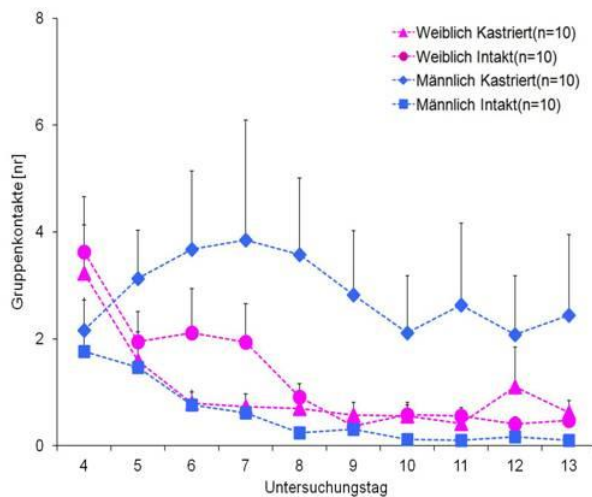
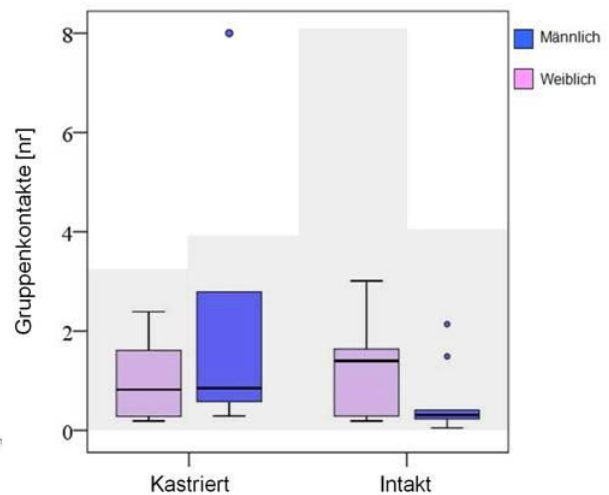
A**B**

Abb. 41: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Gruppenkontakte im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere reduzieren im zeitlichen Verlauf ihre Gruppenkontakte (Zeit^2 : $p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,406$) und der Hormonstatus ($p = 0,126$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflusst die Anzahl der Gruppenkontakte ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,056$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.8 Rearing

Das Aufrichten der Tiere auf die Hinterbeine (Rearing) wird als Indikator für ungerichtete Exploration gewertet. Die Häufigkeit dieses Aufrichtens wird im mZHBT erfasst und ausgewertet (siehe Tab. 24). Aus Abbildung 42 **(A)** geht hervor, dass die Zeit im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Einfluss hat ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$). Die Häufigkeit dieses Aufrichtens reduziert sich im Verlauf. Die Abbildung 42 **(B)** zeigt, dass es im Gesamtmittelwert über 14 Tage zwischen den Gruppen im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,993$) und Hormonstatus ($p = 0,258$) keine signifikanten Unterschiede gibt.

Tab. 24: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Rearings im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	5,6	2,1	1,2	1,0	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	1,2
		\pm STABW	6,6	2,0	1,2	1,5	1,0	0,7	0,5	0,5	0,6	1,0
weiblich	intakt	MW	6,5	2,7	1,5	1,8	1,1	0,6	0,5	1,0	0,8	0,7
		\pm STABW	4,5	2,9	1,5	1,9	1,4	0,9	0,5	1,2	1,0	0,7
männlich	kastriert	MW	8,8	3,1	2,0	1,7	1,9	0,7	0,6	1,2	0,7	1,3
		\pm STABW	5,4	3,5	1,8	2,1	1,8	0,4	0,4	1,3	0,6	1,5
männlich	intakt	MW	5,3	1,9	0,7	0,5	0,5	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1
		\pm STABW	2,9	1,7	0,7	0,5	0,7	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2

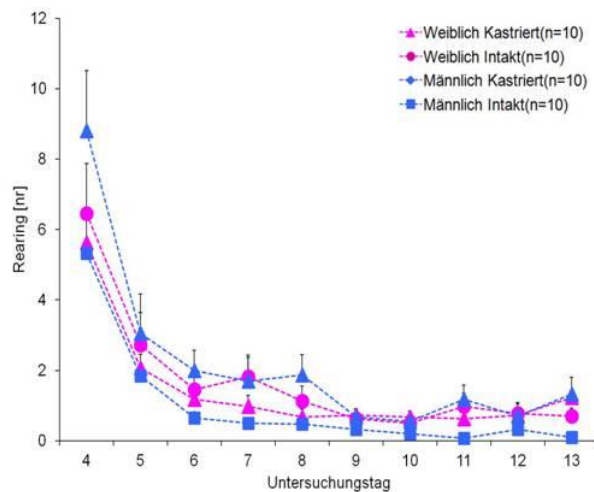
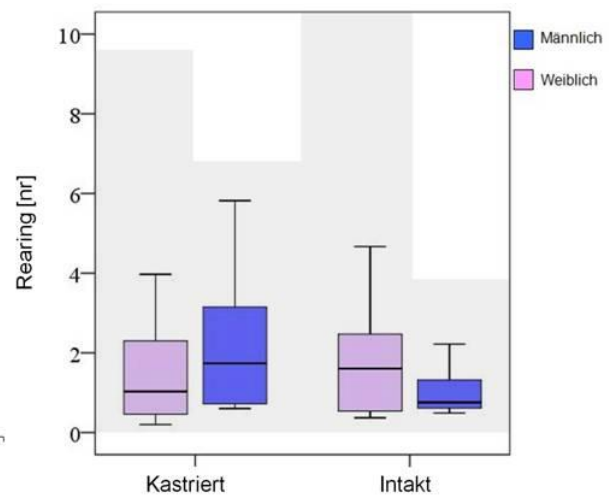
A**B**

Abb. 42: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Rearings im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere reduzieren im zeitlichen Verlauf die Häufigkeit der Rearings ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,993$) und der Hormonstatus ($p = 0,258$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflusst das Rearing ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,081$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.9 Putzphasen („Grooming“)

Die Gesamtanzahl der Putzphasen (Grooming) (siehe Tab.25) gilt als Indikator für die Erregung der Tiere. Aus Abbildung 43 (**A**) geht hervor, dass die Zeit im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Einfluss hat (Zeit²: $p = 0,004$). Die Tiere reduzieren die Putzphasen im zeitlichen Verlauf. Die Abbildung 43 (**B**) zeigt, dass es im Gesamtmittelwert über 14 Tage zwischen den Gruppen im Hinblick auf Geschlecht ($p = 0,568$) und Hormonstatus ($p = 0,391$) keine signifikanten Unterschiede gibt.

Tab. 25: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Putzphasen im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	2,5	1,4	1,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
		\pm STABW	2,3	1,6	2,8	0,2	0,7	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2
weiblich	intakt	MW	2,1	2,4	1,3	0,9	1,3	0,5	0,2	0,1	0,3	0,2
		\pm STABW	2,5	2,5	1,3	1,0	1,9	0,8	0,7	0,3	0,6	0,4
männlich	kastriert	MW	2,6	1,6	1,3	1,6	1,1	1,4	0,5	2,3	2,3	3,6
		\pm STABW	3,6	3,4	2,5	1,9	1,7	2,7	1,3	6,0	4,9	9,0
männlich	intakt	MW	1,5	1,0	0,4	0,3	0,2	0,7	0,2	0,0	0,0	0,0
		\pm STABW	1,2	1,7	0,9	0,3	0,5	1,5	0,4	0,0	0,0	0,0

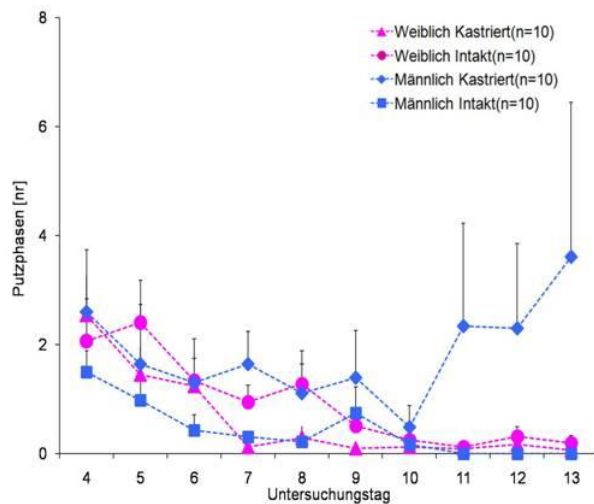
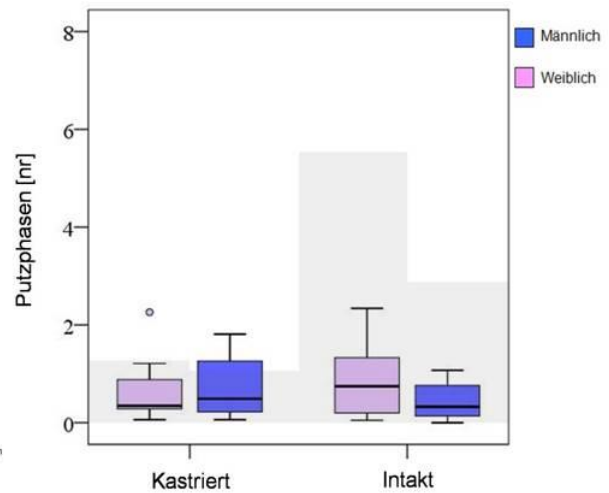
A**B**

Abb. 43: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Putzphasen im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat. Die Tiere reduzieren im zeitlichen Verlauf die Häufigkeit der Putzphasen (Zeit: $p = 0,004$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,568$) und der Hormonstatus ($p = 0,391$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht x Hormonstatus beeinflusst die Anzahl der Putzphasen ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,174$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.6.3.10 Linienquerungen („Line crossing“)

Mit Hilfe der Anzahl der Linienüberquerungen (Linienquerungen) (siehe Tab. 26) lässt sich die allgemeine Bewegungsaktivität und Erregtheit der Tiere ableiten. Aus Abbildung 44 (**A**) geht hervor, dass die Zeit im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Einfluss hat (Zeit²: $p \leq 0,001$). Aus Abbildung 44 (**B**) gehen keine signifikanten Unterschiede bei den Ergebnissen im Gesamtmittelwert über 14 Tage im Hinblick auf das Geschlecht ($p = 0,984$) und auf den Hormonstatus ($p = 0,054$) hervor. Die kastrierten Tiere beiderlei Geschlechts zeigen zwar eine höhere, jedoch nicht signifikante Bewegungsaktivität.

Tab. 26: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Linienquerungen im mZHBT der DHCA-Gruppen an den Tagen 4 bis 13

Tiergruppe			Untersuchungstag									
Geschlecht	Hormonstatus		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
weiblich	kastriert	MW	5	4	5	6	6	5	5	5	6	6
		\pm STABW	2	3	3	3	2	2	2	3	2	2
weiblich	intakt	MW	3	2	3	3	3	4	3	4	5	4
		\pm STABW	2	2	2	2	2	3	3	4	4	3
männlich	kastriert	MW	5	4	5	4	5	4	5	5	6	4
		\pm STABW	2	2	2	2	3	3	4	3	3	2
männlich	intakt	MW	5	5	4	4	4	3	2	2	4	3
		\pm STABW	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3

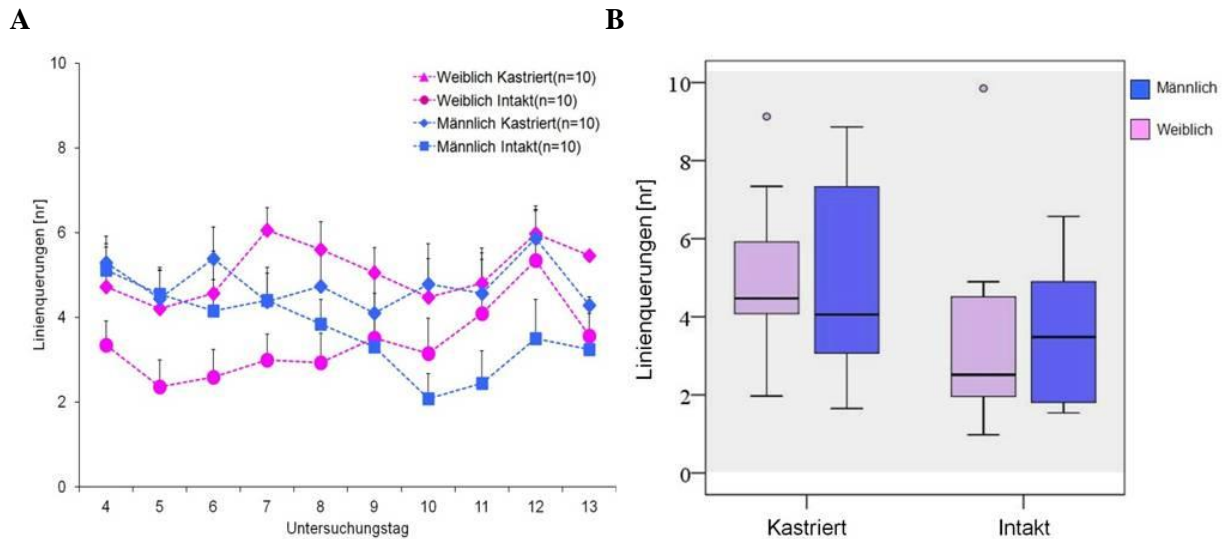


Abb. 44: Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Linienquerungen im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.

Abbildung A: Zeigt, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss hat ($\text{Zeit}^2: p \leq 0,001$).

Abbildung B: Zeigt, dass das Geschlecht ($p = 0,984$) und der Hormonstatus ($p = 0,054$) jeweils für sich keinen signifikanten Einfluss haben. Die Interaktion Geschlecht \times Hormonstatus beeinflusst die Anzahl der Linienquerungen ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,687$).

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

4.7 Histologische Befunde

Die histologische Untersuchung mittels HE- Färbung ist in der Lage, das Ausmaß morphologischer Schädigung im Gehirn aufzuzeigen. Bestimmt wird dazu manuell, in jeweils fünf hoch vergrößerten Feldern (Vergrößerung 400-fach), die Anzahl eosinophiler (= geschädigter) Neuronen und zwar bilateral in den Gehirnregionen Hippokampus, Motorkortex und Striatum.

Der Beurteilungsscore reicht von Werten um **0** (= < 5 geschädigte Neuronen) über **1** (= 5-10 geschädigte Neurone), **2** (= > 10 geschädigte Neurone) bis **3** (= Infarkt). Daraus ergibt sich für jede Gehirnregion ein maximaler Score- Wert von $2 \times (5 \times 3) = \mathbf{30}$, sowie ein maximaler Wert für alle Gehirnregionen zusammen von $3 \times [2 \times (5 \times 3)] = \mathbf{90}$, zur Darstellung maximaler Schädigung. Die Auswertung des hirnmorphologischen Scores (siehe Tab. 27 und Abb.45) zeigt den höchsten Score-Wert für die Gruppe der männlich intakten Tiere ($27,1 \pm 12,1$) und eine deutlich höhere Schädigung von männlichen Tieren. Darüber hinaus zeigt sich, dass sowohl das Geschlecht (männlich gg. weiblich), als auch der Hormonstatus (kastriert gg. intakt) einen signifikanten Einfluss auf das morphologische Outcome nach EKZ und 45 min. DHCA haben (§ = $p < 0,05$ gg. männlich kastriert, * = $p < 0,05$ gg. männlich intakt).

Tab. 27: Mittlere (\pm STABW) histologische Schadensbewertung (Score) von Neuronen der vier DHCA- Gruppen an Tag 14

Tiergruppe			Score je Hirnregion						Gesamt-Score an Tag 14 nach DHCA	
Geschlecht	Hormonstatus		Kortex		Hippo-kampus		Striatum			
			links	rechts	links	rechts	links	rechts		
weiblich	kastriert	MW	6,7	6,1	1,1	1,2	0,8	0,5	16,4	§*
		±STABW	2,4	2,2	1,8	1,4	0,9	0,7	5,4	
weiblich	intakt	MW	7,0	6,1	0,1	0,5	1,3	1,0	16,0	*
		±STABW	2,8	2,6	0,3	1,3	1,8	1,6	8,3	
männlich	kastriert	MW	8,4	9,3	0,5	0,6	2,4	2,6	23,8	
		±STABW	2,5	1,6	1,1	1,1	3,0	2,6	7,7	
männlich	intakt	MW	8,2	9,2	1,5	2,1	3,5	2,6	27,1	
		±STABW	2,0	2,3	2,6	3,3	3,0	2,8	12,1	

Signifikanzen: (§ = $p < 0,05$ gg. männlich kastriert, * = $p < 0,05$ gg. männlich intakt)

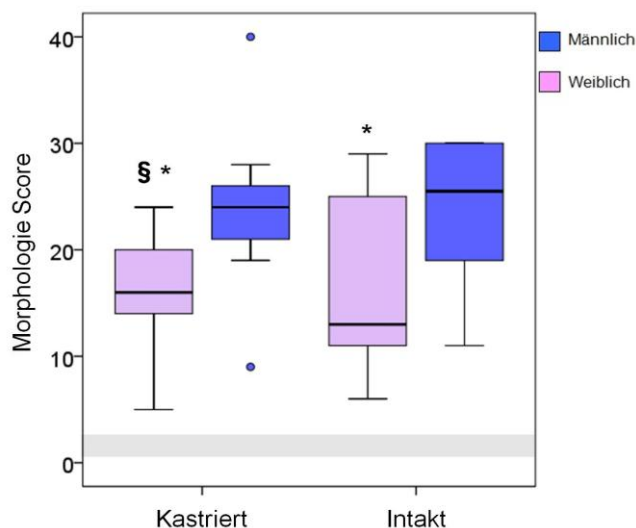


Abb. 45: Box Plot Darstellung des hirnmorphologischen Gesamtscores an Tag 14 nach EKZ mit DHCA

Signifikanzen: § = $p < 0,05$ gg. männlich kastriert, * = $p < 0,05$ gg. männlich intakt.

Der grau hinterlegte Bereich markiert das 95 %- Konfidenzintervall der Kontrollgruppen. Wann immer Geschlecht und/oder Hormonstatus keinen Einfluss auf den entsprechenden Parameter hatten, sind die Kontrollgruppen zusammengefasst worden.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Zum Rattenmodell der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA)

Seit Entwicklung und erstem Einsatz einer Herz- Lungen- Maschine (HLM) durch GIBBON (1954) zur Durchführung chirurgischer Eingriffe am offenen Herzen mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation (EKZ), hat dieses medizintechnische Verfahren eine stete Weiterentwicklung erlebt. Mittlerweile ist es möglich geworden, mit Hilfe der EKZ schwere, meist angeborene Herz- und Gefäßfehler, wie beispielsweise Ventrikelseptumdefekte, Fehlbildungen der großen Gefäße oder an Gefäßen im Gehirn chirurgisch zu versorgen (WOODHALL et al., 1960; OATES et al., 1995; ROACH et al., 1996).

In Deutschland wurden im Jahr 2010 etwa 84.600 Herzoperationen unter Einsatz der HLM durchgeführt, davon 67,7 % an Männern und 32,3 % an Frauen. Rund 49,6 % der Herzoperationen mit HLM entfielen dabei auf Patienten in einem Alter von über 70 Jahren (23. Herzbericht 2010, www.bruckenberg.de, Abfrage am 05.10.2012).

Trotz aller Weiterentwicklungen und Verbesserungen des Verfahrens zeigen sich postoperativ häufig ernste Folgen dieser technisch ermöglichten Eingriffe. Dabei sind es vor allem Frauen, die während und nach herzchirurgischen Eingriffen eine deutlich höhere Morbidität und Mortalität zeigen (GORODESKI, 2002; GURU et al., 2006; ALAM et al., 2012). Auch unter Einbeziehung aller bekannter Risikofaktoren wie höheres Alter, mehr Begleiterkrankungen, geringere Körperoberfläche, geringeres Blutvolumen und mehr Bluttransfusionen, bleibt das weibliche Geschlecht dabei als unabhängiger Risikofaktor bestehen (EDWARDS et al., 1998; VACCARINO et al., 2002; RANUCCI et al., 2008). Als diesen geschlechtsspezifischen Unterschieden zugrundeliegende Ursachen werden sowohl genetische als auch hormonelle Unterschiede diskutiert (KIPP et al., 2006; HERSON et al., 2009; ACS et al., 2009). Vor allem postoperativ auftretende neurokognitive Defizite sind es, die die Patienten in ihrem Alltag mehr oder weniger stark einschränken (ARROWSMITH et al., 2000). Die Ursachen dieser Lern- und Gedächtnisstörungen sind gemäß dem heutigen Kenntnisstand multifaktoriell (GROCOTT et al., 2005). Dieses multifaktorielle und komplexe Geschehen lässt sich in klinischen Studien schwer untersuchen, bedingt durch die sehr eingeschränkte Standardisierungsmöglichkeit für allgemeingültige Erhebungen bei Patienten, die mit

unterschiedlichsten Vor- und Begleiterkrankungen zu einem derartigen Eingriff vorstellig werden. An dieser Stelle ist der Einsatz eines geeigneten standardisierbaren und reproduzierbaren Tiermodells, das das Verfahren der EKZ kliniknah abbilden kann, von Bedeutung.

Bis ein Labortierfähiges EKZ Modell etabliert werden konnte, z.B. adaptiert an die Ratte, wurden vorwiegend Großtiermodelle, beispielsweise Lämmer (BOKESCH et al., 1996), Welpen (FOLKERTH et al., 1975) oder Ferkel (MAULT et al., 1993) eingesetzt. Zahlreiche Nachteile und Limitierungen, wie hohe Anschaffungs- und Haltungskosten, längere Generationsfolge im Vergleich zu Nagetieren und das Fehlen geeigneter standardisierter Tests für neurologische und kognitive Untersuchungen. Darüber hinaus werden Lebensmittel-liefernde Tiere oder Haustiere in der breiten Öffentlichkeit deutlich schlechter als Versuchstiere akzeptiert als (GINSBERG und BUSTO, 1989). Vor diesem Hintergrund erschien die Ratte als ein weitaus geeigneteres Versuchstier. Im Jahre 2006 gelang es schließlich ein EKZ Modell an die Ratte anzupassen, das auch mit dem langfristigen Überleben dieser Tiere vereinbar ist (JUNGWIRTH et al., 2006).

Dieses Modell erlaubt es erstmals, postoperativ neurologische und neurokognitive Defizite in Zusammenhang mit histologischen Defekten im Gehirn im Langzeitversuch zu untersuchen (JUNGWIRTH et al., 2006). Der verwendete Membranoxygenator ist mit einem Füllvolumen von 10 ml speziell auf die Ratte abgestimmt und entspricht den Verhältnissen in der Klinik: 10 ml Füllvolumen auf 25 ml Blutvolumen bei der Ratte, 2 l Füllvolumen auf 5 l Blutvolumen beim Menschen. Das geringe Gesamtfüllvolumen dieses speziellen Oxygenators erlaubt zudem die Durchführung der EKZ ohne Fremdblut von Spendertieren. Der Hämatokrit der Tiere an der EKZ liegt bei Werten zwischen 18 und 22 % und entspricht damit auch in diesem Parameter den Verhältnissen in der humanmedizinischen klinischen Versorgung.

Zudem können in diesem Modell Blutflussraten aufrecht erhalten werden, wie sie dem normalen Herzzeitvolumen der Ratte von 160 – 180 ml/kg/min entsprechen (JUNGWIRTH et al., 2006).

Trotz der großen Nähe dieses experimentell nutzbaren Modells zur klinischen Situation muss eine direkte Übertragung von Befunden daraus immer kritisch hinterfragt werden. Denn so ist u. a. das chirurgische Trauma, ein ständiges Merkmal der herzchirurgischen Patientenversorgung, in der hier gewählten Ausrichtung des Rattenmodells nicht durchführbar. Ziel der Studie war die Untersuchung der motorischen und kognitiven Funktion nach EKZ mit 45 min DHCA, wofür ein sicheres und mehrheitliches Überleben der Tiere wichtige Voraussetzung ist. Eine Operation mit Eröffnung des Thorax und einer

Durchtrennung der Pektoralismuskulatur führen postoperativ zwangsläufig zu Bewegungseinschränkungen und zu stark verminderter Futteraufnahme bei den Tieren (WEHBERG et al., 1996; TRIGGIANI et al., 1970) . Zudem handelt es sich bei den Versuchstieren um klinisch gesunde, junge Tiere ohne Komorbiditäten wie z.B. Diabetes mellitus, Atherosklerose, etc. (JUNGWIRTH et al., 2006).

5.1.2 Zur Eignung der neurologischen Untersuchungen

Postoperativ durchgeführte neurologisch- motorische Tests stellen wichtige Hilfsmittel zur Darstellung und Beurteilung neurologisch- motorischer Defizite nach herzchirurgischen Eingriffen dar. Aktive Tests schaffen zudem die Möglichkeit, neurologisch- motorische Defizite besser hervortreten zu lassen, als es durch passives Beobachten des rekonvaleszenten Tieres alleine möglich wäre (COMBS und D'ALECY, 1987). Der Komplex der neurologischen Untersuchung der vorliegenden Studie umfasst etablierte Tests, die eine Bewertung mittels eines Punktesystems zulassen. Sie geben Aufschluss über Gleichgewicht (Beam Walking- und Beam Balance- Test), allgemeine Muskelkraft, Greif- und Haltevermögen (Rotating Grid- und Prehensile Traction- Test).

Der **Beam- Walking- Test** wurde erstmals 1982 bei der Ratte eingesetzt, um Defizite im Bereich des Motorkortex zu untersuchen (FEENEY et al., 1982). Ihm zugrunde liegt die Beurteilung des Gleichgewichtssinns und der Koordinationsfähigkeit der Tiere in der Bewegung. Störungen im Bewegungsablauf können anhand der Fehlritte, welche sich beim Laufen über eine Strecke von 3 x 100 cm zeigen, erfasst werden. Um stressbehaftete und somit Angst auslösende Einflüsse zu reduzieren, müssen die Tiere immer von derselben Person unter Zuhilfenahme derselben Hilfsmittel getestet werden. Der Untersucher muss dabei auf eine ruhige Vorgehensweise und die Vermeidung hektischer Bewegungen achten.

Der **Beam- Balance- Test** ist ein umfassenderer Test, der die vestibulomotorische Funktion, den Gleichgewichtssinn und die Funktion des Kleinhirns zu beurteilen erlaubt (FUJIMOTO et al., 2004). Mit Hilfe dieses Tests lassen sich vor allem einseitige Gehirnläsionen die mit Hemiparesen einhergehen, relativ leicht untersuchen. Die betroffenen Tiere kippen zur entsprechenden geschädigten Seite hin vom Balken. Der Test gilt als weit verbreitet und wurde in den letzten Jahren zur Erfassung und Beurteilung verschiedenster Schädigungen eingesetzt (TUPPER und WALLACE, 1980; DIXON et al., 1987; COMBS und D'ALECY, 1987; GERMANO et al., 1994; DEGRABA et al., 1994).

Die Tiere müssen bei diesem Test 3 x jeweils 60 s auf dem Balken balancieren. Kann sich die Ratte auf dem Balken nicht halten, spricht man von einem Defizit im Gleichgewichtssinn und/oder in der Muskelkraft. Von echter Beeinträchtigung zu unterscheiden ist spielerisches Verhalten, bei dem die Tiere sich auf die Hinterbeine aufrichten und deshalb vom Balken fallen können. Die Abgrenzung hiervon ist allerdings durch die Mit-Betrachtung des Gesamtzustandes des Tieres relativ leicht möglich. Tiere, die aufgrund einer Schädigung

Probleme auf dem Balken haben, sind in der Regel vom Allgemeinbefinden her beeinträchtigt. Wohingegen Tiere, die durch ihr spielerisches Verhalten vom Balken fallen, normal gesundes Allgemeinbefinden zeigen.

Der **Prehensile- Traction- Test** dient der Erfassung und Beurteilung der vorhandenen Muskelkraft, sowie des Greif- und Haltevermögens. Er wird häufig nach Vorderhirn- und fokalen zerebralen Ischämien durchgeführt (COMBS und D'ALECY, 1987; DEGRABA et al., 1994). Die Schädigungen zeigen sich beim Festhalten am Drahtseil als ein- oder beidseitiges Unvermögen, sich mit den Vorderpfoten am Seil festzuhalten. Wichtig bei diesem Test ist ein ausreichender Abstand zwischen Drahtseil und Boden. Denn berührt der Schwanz der Ratte den Boden, kann sie die Höhe eher abschätzen und neigt zum Abspringen. Kritisch ist jedoch zu bewerten, dass manche Tiere trotz eines ausreichenden Abstandes zwischen Seil und Boden erkennen und lernen, dass ein etwaiger Sturz für sie gefahr- und folgenlos bleibt.

Der **Rotating- Grid- Test** ist ebenfalls zur Beurteilung der vorhandenen Muskelkraft und des Gleichgewichtssinnes geeignet. Dieser Test stellt eine Modifizierung des sog. „Screen- Tests“ dar, welcher unter anderem häufig zur Beurteilung von Schädigungen nach Vorderhirn-Ischämien eingesetzt wird (COMBS und D'ALECY, 1987). Der Untersucher muss bei diesem Test vor allem darauf achten, das Drahtgitter mit gleichbleibender Geschwindigkeit von der horizontalen über die 90°- Ebene in die 180°- Ebene zu drehen. Dreht man zu langsam, versuchen die Tiere am Gitter hochzuklettern. Dreht man zu schnell, können die Tiere den Halt verlieren und vom Gitter herunterfallen. Die Aussagekraft auch dieses Tests hängt u.a. von der Motivation der Tiere ab, die mit zunehmender Häufigkeit dieser Testung nachlässt.

Um insgesamt ein möglichst hohes Maß an Standardisierung bei den neurologischen Untersuchungen zu erreichen, wurden alle Tests immer in derselben Ab- und Reihenfolge von stets derselben Person durchgeführt. Eine stabile Ausgangsbasis („Baseline“) wurde sichergestellt, indem die Tiere nicht nur an einem, sondern an zwei Tagen präoperativ (Tag -2 und -1) dieser neurologischen Untersuchung unterzogen wurden. Ein wichtiges Kriterium ist auch der Tageszeitpunkt für die Testung. In vorliegender Untersuchung wurden alle Tests zwar am Ende, aber doch noch während der Hell- Phase durchgeführt, der eigentlichen Ruhezeit der Tiere. Um eine umfassende und sinnvolle Durchführung und Beurteilung derartiger Untersuchungen gewährleisten zu können, ist es wichtig, dass der Untersucher das Tier für die gesamte Testdauer gut sehen kann, was nur in der Hell-Phase möglich ist. Die Untersuchung am Ende der Hell- Phase/ kurz vor Beginn der Dunkel- und damit Aktivitätsphase der Tiere ist demzufolge als notwendiger Kompromiss zu verstehen.

5.1.3 Zur Eignung des modifizierten Zylinder Hole Board Tests (mZHBT)

Die Nutzung des modifizierten Zylinder Hole Board Tests (mZHBT) bietet die Möglichkeit, auf multiple Testbatterien verzichten zu können. Die Tierzahl und der zeitliche Aufwand der Tiertestung kann so erheblich eingeschränkt werden. Und trotzdem erlaubt der mZHBT die Untersuchung einer Vielzahl von Kognitionsparametern im Kontext des Verhaltens in einem einzigen Test. Er kann damit Einblicke in die Funktion der verschiedenen Gedächtnissysteme geben (OHL et al., 2001 (a)). Lern- und Gedächtnisleistung können dabei dem Hippokampus (deklaratives Gedächtnis) und präfrontalem Kortex (Arbeits- bzw. Kurzzeitgedächtnis) zugeordnet werden (OHL und FUCHS, 1999). Das Testprinzip beruht auf der Vorstellung, dass das Verhalten von Nagern unmittelbar im Kontext mit ihrer Umgebung steht (OHL et al., 2001 (b)). Doch Tiere können ihr gesamtes Verhaltensrepertoire nur in einer adäquat angereicherten Testumgebung zeigen (OHL und KECK, 2003).

Für sicher reproduzierbare und aussagekräftige Testergebnisse ist zudem eine möglichst stressarme Umgebung notwendig, die im mZHBT ebenfalls geboten ist (OHL et al., 1998). Stress auslösend wirken bei Ratten beispielsweise Isolation und das Verbringen in andere Räumlichkeiten (OHL et al., 2001 (a)). Der mZHBT erlaubt die Untersuchung der Tiere in Ihrer bekannten Umgebung, dem sog. „Homecage“, in dem Wohnabteil und Testarena lediglich durch eine durchsichtige und perforierte Plexiglaswand voneinander getrennt werden. Dies bietet den Tieren ständig die Möglichkeit zur olfaktorischen, visuellen und taktilen Kontaktaufnahme mit ihren gewohnten Gruppenmitgliedern. Zusätzlich kommt der Test ohne Futterentzug und andere negative Stimuli aus.

Der mZHBT bedient sich des natürlichen Verhaltensrepertoires von Nagetieren bei der räumlichen Erkundung und der Futtersuche (OHL und KECK, 2003). Da Ratten kein ihnen unbekanntes Futter aufnehmen, werden die Tiere vor Testbeginn an die Testbelohnung (Mandelblättchen) gewöhnt. Um ausschließen zu können, dass sich die Tiere beim Auffinden der Futterbelohnung anhand ihres sehr ausgeprägten Geruchssinns orientieren, enthalten alle Löcher die gleiche Menge Mandelblättchen unerreichbar für die Tiere unterhalb des Drahtgitters (siehe Abb. 21). Darüber hinaus werden alle Löcher gleichmäßig mit verdünnter Johannisbeerlösung benetzt. Weitere störende olfaktorische Einflüsse können zudem durch das Tragen von Handschuhen, das Anbringen der Markierungen bereits am Vortag und die Reinigung der Testanordnung während des Versuchs mit klarem Wasser reduziert bzw. vermieden werden.

5.1.4 Zur histologischen Darstellung neuronaler Schäden

Die Hämatoxilin- Eosin (HE) – Färbung ist eine Standardmethode, um eine Übersicht über Struktur und Morphologie auch von neuronalem Gewebe zu bekommen und, um dadurch gleichzeitig auch das Ausmaß von neuronalen Schädigungen ermitteln zu können. Ischämische Ereignisse während EKZ und DHCA führen zu einem Sauerstoffmangel und dadurch auch zu einem Energiemangel von Zellen (PERLMAN, 2004). In deren Folge reichern sich saure Stoffwechselprodukte in den betroffenen Zellen an. Diese Ansäuerung kann schließlich durch den azidophilen Farbstoff Eosin pink-rot angefärbt und sichtbar gemacht werden. Stoffwechsel-normale und somit ungeschädigte Zellen weisen ein eher basisches Milieu auf und färben sich mit dem basophilen Farbstoff Hämalaun als blassblaue Zellen. Eine weitere differenziertere Beurteilung, ob es sich z.B. bei den geschädigten Zellen um apoptotisch oder nekrotisch zugrundegehende Zellen und ob es sich dabei möglicherweise um einen reversiblen Vorgang handelt, ist durch den Momentaufnahme- Charakter des histologischen Schnittes und die einfache HE-Färbung allerdings nicht möglich.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Parametrische und endokrine physiologische Befunde

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe diverser Tests zur motorischen und kognitiven Funktion sowie mit Hilfe von Verhaltensstudien, einen Einblick in die postoperative funktionelle Situation über 14 Tage nach einer extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit 45 min tief hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA), bei männlichen und weiblichen Ratten sowie bei Kastraten beiderlei Geschlechts zu erhalten. Die Ergebnisse zeigen, dass zwar die motorische Leistungsfähigkeit bei den weiblichen Tiergruppen besser ist als bei den männlichen Tiergruppen. Sie zeigen aber auch, dass sich Kognition und Verhalten aller Versuchstiere im Normalbereich der unbehandelten Kontrollgruppen bewegen und, dass über 14 Tage nach DHCA kein Einfluss des Geschlechts erkennbar ist. Der Hormonstatus beeinflusst das Angstverhalten. Kastrierte Tiere zeigen mehr Angst und weisen ein besseres Arbeitsgedächtnis auf, allerdings insgesamt gesehen ebenfalls im Normbereich der unbehandelten Kontrollgruppe.

Es fällt jedoch auf, dass die weiblich intakte Gruppe eine vergleichsweise hohe Ausfallrate während der ersten vier postoperativen Tage zeigt. In dieser Gruppe mussten insgesamt 32 weiblich intakte Tiere einer EKZ mit DHCA unterzogen werden, um 10 weiblich intakte Tiere für die neurokognitive Untersuchung zu erhalten. Eine wichtige Ergänzung dieser Studie, die Morphologie des Gehirns, ergab insgesamt gesehen geringere morphologische Schäden bei den weiblichen Gruppen.

Das verwendete Modell des 45 minütigen DHCA mit Langzeitüberleben bei Ratten ist bekannt dafür, leichte motorische und neurokognitive Defizite zu verursachen (JUNGWIRTH et al., 2006). Um den Einfluss von Geschlecht und Hormonstatus so nah wie möglich an den klinischen Gegebenheiten darstellen zu können, wurden gleichaltrige, geschlechtsreife männliche und weibliche Tiere verwendet. Jeweils die Hälfte der weiblichen und die Hälfte der männlichen Tiere wurde kastriert, um, insbesondere bei den weiblichen Tieren, den postmenopausalen Hormonstatus darstellen zu können. Die jeweils andere Hälfte der Tiergruppen wurde intakt belassen, um einen physiologischen Hormonstatus zu erhalten (GIBBS und GABOR, 2003). Die höhere Inzidenz für die perioperative Mortalität während herzchirurgischer Eingriffe bei weiblichen Individuen, wie sie klinisch beschrieben ist (HOGUE et al., 2008; ALAM et al., 2012), konnte in diesem Versuch nur anhand der höheren Anzahl an weiblichen Tieren nachvollzogen werden, die notwendig war um in jeder Gruppe

ein $n = 10$ zu erreichen.

Die physiologischen Erhebungen zeigen sowohl Geschlechts- als auch Hormonstatus-bezogene Unterschiede beim Körpergewicht. Wie erwartet wiegen weiblich intakte Tiere ca. 15 – 30 % weniger verglichen mit den anderen Gruppen (Männlich Intakt: 423 ± 5 g; Weiblich Intakt: 300 ± 5 g). Dieser signifikante Gewichtsunterschied und der daraus folgende Körpergrößenunterschied müssen berücksichtigt werden. Ein geringeres Gewicht und demzufolge auch eine geringere Körperoberfläche wurden bereits als Risikofaktor im humanklinischen Bild beschrieben (RANUCCI et al., 2008). Unabhängig davon bleibt aber der Faktor Geschlecht mit einer höheren postoperativen Morbidität assoziiert (VACCARINO et al., 2002). In der vorliegenden Studie kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in Gewicht und Körpergröße mit der hohen Ausfallrate bei den weiblich intakten Tieren zusammenhängen. Doch da Gehirnstrukturen und deren Entwicklung altersabhängig sind (ELKIN et al., 2010) und ein Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Studie auf der postoperativen Neurokognition liegt, haben wir dem Alter die größere Bedeutung beigemessen und dem Gewicht übergeordnet. Deshalb wurden speziell Ratten gleichen Alters, aber unterschiedlichen Gewichts untersucht.

Um jedoch den Faktor Körpergewicht in diesem speziellen Fall auszuschließen (Die Daten hierzu sind in vorliegender Arbeit nicht aufgeführt), wurden nachträglich noch sechs jüngere und damit leichtere männlich intakte Tiere (302 ± 8 g) dem Versuchsprotokoll unterzogen. Die Ergebnisse sind denen der schweren intakten Männchen ähnlich: Keines der leichten männlichen Tiere ist ausgefallen. Die übrigen physiologischen Parameter, wie beispielsweise Glukose, Hämoglobin, Sauerstoffsättigung die das Ergebnis nach DHCA beeinflussen können, usw. (SHANN et al., 2006; FERRARIS et al., 2007) waren ähnlich zwischen der weiblich intakten und der leichteren männlich intakten Gruppe. Wir schlussfolgern daraus, dass die höhere Ausfallsquote in der weiblich intakten Gruppe der vorliegenden Untersuchung sehr wahrscheinlich nicht in Zusammenhang mit dem vergleichsweise geringeren Körpergewicht steht.

Bei fast allen physiologischen Parametern wurden über die Zeit bei allen vier Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten signifikante geschlechts- und hormonspezifische Unterschiede festgestellt. Einzig der MAP blieb davon unbeeinflusst.

Hämoglobin und Sauerstoffpartialdruck waren in der Gruppe der männlich intakten Tiere am höchsten. Nach Beginn der EKZ sind diese beiden Parameter zu denen der übrigen Gruppen ähnlich. Geschlechts- und hormonbezogene Unterschiede im Säure- Basen Gleichgewicht im

Blut wurden beschrieben, allerdings nur unter physiologischen Bedingungen und somit schwer vergleichbar mit der experimentell gegebenen Situation der EKZ wie sie hier Verwendung fand (SHOCK und HASTINGS, 1934; FRASSETTO und SEBASTIAN, 1996).

Es ist bekannt, dass eine globale Ischämie durch den mangelnden Abtransport von Stoffwechselprodukten zu einer Gewebs- und nachfolgend zu einer Blutazidose führen kann (RANUCCI et al., 2008). In welchem Ausmaß jedoch der BE das postoperative Ergebnis beeinflusst, z. B. dahingehend, dass der signifikant niedrigere BE, eine Stunde nach DHCA bei der weiblich intakten Gruppe, eine ungenügende Nierenfunktion anzeigt, bleibt rein spekulativ (FUNK, 2007). Um einen derartigen Zusammenhang sicher abzuklären, wären weitere Studien notwendig, die auf die Nierenfunktion nach DHCA fokussieren, und entsprechende Nierenparameter aus dem Blut (u. a. Harnstoff, Kreatinin) erfassen.

Um die Bedeutung der Faktoren Geschlecht und/oder Hormonstatus auf das Überleben und die postoperative Funktion tiefergehend untersuchen zu können, müsste zudem ebenfalls eine eigene Studie durchgeführt werden, in deren Rahmen dann weitere wichtige Organe wie Herz, Lunge, Leber und Darm untersucht werden könnten. Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag auf der postoperativen Untersuchung von Kognition, Verhalten und Motorik nach EKZ mit 45 minütigem DHCA, was ein langfristiges Überleben der Tiere voraussetzt. Aufgrund dieser Zeitvorgabe konnten auch keine zusätzlichen Blutproben entnommen werden, um die Entwicklung des Blutglukosespiegels noch über den Zeitraum eine Stunde nach EKZ hinaus zu überwachen und in der vorliegenden Studie einen möglichen Zusammenhang zwischen Blutglukose und Morbidität/ Mortalität herzustellen. Obwohl die Blutglukosespiegel in der Gruppe der männlich intakten Tiere eine Stunde nach Ende der EKZ am höchsten waren, waren sie zu den übrigen zentralen Messzeitpunkten („prä-DHCA“, „post-DHCA“, „EKZ Ende“) des operativen Eingriffs (SHANN et al., 2006) zwischen den Gruppen ähnlich. Hinzu kommt, dass die Bedeutung der Höhe des Blutglukosespiegels vor, während und nach einer EKZ noch immer kontrovers diskutiert wird und es bis heute keine allgemeingültigen Richtlinien dazu gibt (VAN DEN BERGHE, 2007).

5.2.2 Neurologisch- motorische Befunde

Betrachtet man die postoperative neurologische Funktion, waren bei allen vier DHCA-Gruppen motorische Defizite nach EKZ erkennbar. Weibliche Ratten schnitten insgesamt besser ab, jedoch unabhängig vom Hormonstatus. Geschlechtshormone beeinflussen bekanntlich das neuromuskuläre System. Doch während Studien einerseits eine Abnahme der Muskelmasse bei postmenopausalen Frauen aufzeigen (HORSTMAN et al., 2012) zeigen andere, dass die Muskulatur von den systemischen Geschlechtshormonspiegeln unabhängig reguliert werden (POLLANEN et al., 2011). Ob sich weibliche oder männliche Geschlechtshormone positiv oder negativ auf die postoperative neurologische Funktion auswirken, scheint vom Versuchsaufbau abhängig zu sein und wird kontrovers diskutiert. So gibt es Studien, die nach einer permanenten zerebralen Ischämie einen positiven Effekt von physiologischen 17 β - Östradiol- Spiegeln bei jungen und auch alten Ratten zeigen (DUBAL und WISE, 2001). NUSSMEIER et al. (2002) konnten eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen, nachdem Frauen vor koronaren Bypass- Eingriffen unter EKZ mit Geschlechtshormonen supplementiert worden waren (NUSSMEIER et al., 2002). Bei älteren Männern führte die Gabe von Testosteron zu einer verbesserten Stoffwechselfunktion und einer allgemein höheren Lebensqualität (EMMELOT-VONK et al., 2008). Neben den genannten positiven Effekten wird aber auch über negative Auswirkungen von Geschlechtshormonen berichtet. So zeigte eine Studie an Ratten, mit einem experimentell induzierten Verschluss der mittleren Hirnarterie („Middle cerebral artery occlusion“, MCAO), einen schädlichen Einfluss von 17 β - Östradiol auf die Morphologie von Axonen und Neuronen (BINGHAM et al., 2005). Für Testosteron konnte in einem Ischämie-Reperfusionsmodell bei Mäusen eine signifikante Verschlechterung des neuronalen Schadens gezeigt werden (NAKANO et al., 2010). Die „Womens Health Initiative Study“, eine umfangreiche Studie mit mehr als 16.000 Frauen, musste aufgrund eines erhöhten Schlaganfall- Risikos bei den mit Östrogen- / Progestin- supplementierten Gruppen abgebrochen werden (ROSSOUW et al., 2002). Eine vielversprechende Plazebo- Studie mit der Beteiligung von 174 postmenopausalen Frauen, konnte ebenfalls keinen positive Effekt von 17 β - Östradiol auf die kognitive Leistungsfähigkeit nach einem herzchirurgischen Eingriff zeigen (HOGUE et al., 2007). Diese widersprüchlichen Ergebnisse führen zu der Annahme, dass der Einfluss der Geschlechtshormone auf das strukturelle und/oder funktionelle Ergebnis stark vom Versuchsaufbau und den darin enthaltenen Faktoren, wie Art und Schwere der Schädigung, Dauer der Menopause, dem Beginn der Hormonsupplementierung, etc., abhängen.

5.2.3 Befunde zu Neurokognition und Verhalten

Die Kognitiven Leistungstests und die Verhaltensstudien zeigen bei allen vier DHCA-Gruppen ähnliche, von den unbehandelten Kontrollgruppen her bekannte Ergebnisse. Bei keinem der erhobenen Parameter ist ein Einfluss des Geschlechts erkennbar. Der Hormonstatus beeinflusst die Ängstlichkeit der Tiere: Kastrierte Tiere haben mehr Angst als intakte Tiere, wobei der dadurch erreichte Einfluss eines veränderten Hormonstatus geschlechtsunabhängig ist. Das Arbeitsgedächtnis wird ebenfalls vom Hormonstatus beeinflusst, sichtbar daran, dass die kastrierten Tiere weniger Fehler machen als die intakten Tiere. Diese Beobachtung ist ebenfalls unabhängig vom Geschlecht der kastrierten Tiere. Doch auch diese zahlenmäßigen tendenziellen Unterschiede sind nicht signifikant. Sie liegen in den normalen, von den Kontrolltieren her bekannten Bereichen. Man hätte erwarten können, dass die weiblich intakten Tiere mit physiologischen Serumhormonwerten neurokognitiv besser als die drei übrigen Gruppen abschneiden, da ein neuroprotektiver Einfluss von weiblichen Geschlechtshormonen auf Neurone weitgehend anerkannt ist. Zudem schreibt man ihnen eine Bedeutung beim Lernen und der Gedächtnisbildung zu (FRYE und WALF, 2008 (a); FRYE und WALF, 2008 (b); DURHAM et al., 2012). Der überwiegende Teil der Studien, welche diese Gehirnfunktion nach Schädigung untersuchen, berichten von neuroprotektiven Effekten und einem Defizitverbessernden Effekt von 17 β - Östradiol (MERCHENTHALER et al., 2003; LEBESGUE et al., 2009) (LEBESGUE et al., 2009; MERCHENTHALER et al., 2003) und Progesteron (PAN et al., 2007).

Weshalb in der vorliegenden Studie allerdings das Geschlecht keinerlei Auswirkungen auf die postoperative kognitive Funktion hat, darüber können nur Vermutungen angestellt werden. Eine nicht ausreichende Sensitivität der Tests scheint unwahrscheinlich, da der mZHBT bereits vielfach erfolgreich angewendet wurde, um sensitiv Kognition, Verhalten und Feinmotorik nach verschiedensten Schädigungen zu untersuchen (JUNGWIRTH et al., 2007; KELLERMANN et al., 2010). Hinzu kommt, dass der mZHBT dem weltweit am meisten eingesetzten Morris Water Maze Test in seiner Sensitivität überlegen ist (GORDAN et al., 2012).

5.2.4 Histologische Befunde

Die histologischen Untersuchungen der hirnmorphologischen Veränderungen ergeben in den, für eine Ischämie besonders empfänglichen Bereichen des Striatum, Kortex und Hippokampus (PULSINELLI et al., 1982) geschlechtsspezifische Unterschiede. So zeigen die weiblichen Tiere eine deutlich geringere Anzahl geschädigter Neuronen als die männlichen Tiere. Erwartet hätte man einen positiven Effekt der weiblichen Sexualhormone, insbesondere des 17 β - Östradiol auf das Ausmaß der neuronalen Schädigung. Östrogen entfaltet seine neuroprotektive Wirkung während und nach zerebralen Ischämien unter anderem durch die Reduktion von oxidativem Stress (BEHL et al., 1997; DURHAM et al., 2012) und durch die positive Einflussnahme auf anti-inflammatorischen Signalkaskaden (BRUCE-KELLER et al., 2000). Die neuroprotektive Wirkung war jedoch bei den weiblich intakten Tieren der vorliegenden Untersuchung nicht so prominent wie erwartet, obwohl die 45 min dauernde globale Ischämie (während des DHCA) dieses Modells sehr wohl oxidativen Stress und Folge eine inflammatorische Folgereaktion auslöst (JUNGWIRTH et al., 2009). Allerdings konnten in dieser Untersuchung auch keine negativen Effekte von Testosteron auf die neuronale Morphologie bei den männlich intakten Tieren festgestellt werden. Obwohl eine Verschlechterung der neuronalen Schadenssituation durch Testosteron, bzw. eine Verschlimmerung der Ischämie-bedingten Reperfusionsschäden beschrieben wird (YANG et al., 2002; NAKANO et al., 2010). Mit ein Grund für die vorliegenden Ergebnisse dürfte der späte Untersuchungszeitpunkt sein. Da die Studie ihren Schwerpunkt auf die Darstellung postoperativer neurokognitiver Funktionen gelegt hatte, konnten folglich die Gehirne erst post mortem am postoperativen Tag 14 entnommen und untersucht werden. Die histologische Untersuchung der Gehirne von Tag 14 nach DHCA ist spät, verglichen mit anderen Untersuchungen (YANG et al., 2002; NAKANO et al., 2010). Darüber hinaus ist die Beobachtung eines Hormon-unabhängigen, sexuellen Dimorphismus bei nicht geschlechtsreifen Ratten beschrieben (ROSAMOND et al., 2007; NIJBOER et al., 2007). Ob allerdings der Zeitraum zwischen Schadenseintritt und Untersuchung des Schadens tatsächlich eine Ursache für die fehlenden hormonellen Einflüsse ist, oder ob die Ischämie- bedingten Reperfusionsschäden nach DHCA wirklich mehr von geschlechtsspezifischen Faktoren als vom Konzentrationsniveau der zirkulierenden Geschlechtshormone abhängt, kann mit der vorliegenden Studie noch nicht eindeutig beantwortet werden.

5.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Das Hauptaugenmerk der Studie lag auf der Untersuchung der Kognition, des Verhaltens und der motorischen Funktion über 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA. Die erhöhte perioperative Mortalität der weiblichen, und dabei besonders der weiblich intakten Tiere ist daher als Zufallsbefund zu bewerten. Für eine fundierte statistisch belegbare Aussage hinsichtlich der Mortalität ist die Aussagekraft der Studie zu gering. Zudem konnten die Gehirne der nicht überwacht verstorbenen Tiere nicht untersucht werden, so dass die Beurteilung des zerebralen Schadens durch die EKZ mit dem DHCA bei diesen Tieren nicht möglich ist. Um diesen Aspekt der Mortalität näher zu untersuchen, werden somit weitere Untersuchungen notwendig sein, die nicht zuletzt auch deshalb interessant sind, da die weiblichen Tiere, sobald sie den vierten postoperativen Tag überlebt hatten, die bessere motorische Funktion bei gleichzeitig weniger geschädigten Neuronen zeigten.

Obwohl die vorliegende tierexperimentelle Studie die klinische Situation weitgehend abbildet, bleiben doch einige Unzulänglichkeiten bestehen. Da bei Ratten eine EKZ alleine keine Auswirkungen auf die postoperativen Funktionen hat, wurde die EKZ in dieser Studie noch durch einen DHCA ergänzt (JUNGWIRTH et al., 2009). Hinzu kommt, dass dieses Modell bezüglich seines postoperativen funktionellen Ergebnisses sehr gut beschrieben ist (KELLERMANN et al., 2009; KELLERMANN et al., 2010). Ein wichtiges Defizit dieser Modellstudie ist auch das fehlende herzchirurgische Trauma. Um das Langzeitüberleben der Tiere zu gewährleisten, wurde auf die mediane Sternotomie und/oder eine direkte Herzkannulierung- beides gehört zu einer klinischen Situation- verzichtet. Hinzu kommt, dass für diese Studie junge und gesunde Ratten verwendet wurden, die keine Vor- und/oder Begleiterkrankungen haben, wie sie z.B. für ältere Patienten typisch sind. Man hat darüber hinaus auf in dieser Studie auf die relativ aufwendige Zyklusbestimmung bei den weiblich intakten Tieren verzichtet und damit eine größere Streubreite bezüglich der Serumhormonkonzentrationswerte zum Zeitpunkt des Eingriffes in Kauf genommen. Auch die fehlende kontinuierliche Überwachung wichtiger Herz- Kreislaufparameter, wie beispielsweise der Herzfrequenzen, sollte in nachfolgenden Studien Berücksichtigung finden. Wie wir jetzt wissen, stellen diese für die vulnerabelste frühe postoperative Phase während der ersten vier Tage nach EKZ und DHCA eine Limitation dar.

6 Zusammenfassung

Zum Einfluss von Geschlecht und Geschlechtshormonstatus auf neurologische und neurokognitive Funktionen sowie auf die Gehirnmorphologie 14 Tage nach herzchirurgisch typischer Extrakorporaler Zirkulation mit 45-minütigem tief hypothermem Kreislaufstillstand im Rattenmodell

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Geschlecht und Geschlechtshormonstatus auf die neurokognitive Funktion und die neuronale Morphologie 14 Tage nach herzchirurgisch typischer extrakorporaler Zirkulation (EKZ) und 45 min tief hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) im Rattenmodell zu untersuchen.

Hierfür wurden 40 männliche und 40 weibliche Ratten gleichen Alters randomisiert auf 2 Gruppen verteilt: 40 Tiere wurden einer EKZ mit DHCA unterzogen und über 14 Tage nach DHCA kognitiv getestet, 40 Tiere wurden als Kontrollen über 14 Tage nur kognitiv getestet. In beiden Gruppen, „DHCA“ und „Kontrolle“, wurden, um den Geschlechtshormonstatus zu verändern, jeweils 20 Tiere beiderlei Geschlechts kastriert, 20 Tiere beiderlei Geschlechts wurden intakt belassen. 4 Wochen nach Kastration wurden die Tiere der DHCA- Gruppen mit Isofluran (2,0 – 2,5 Vol. % in 40 % O₂) anästhesiert, intubiert, katheterisiert, an die EKZ angeschlossen, auf 15 – 18 °C rektale Körpertemperatur abgekühlt und ein DHCA initiiert. Nach 45 minütigem DHCA wurden die Tiere innerhalb von 40 min an der EKZ auf 35,5 °C rektale Körpertemperatur wiedererwärmt. Nach Ende der EKZ wurden die Tiere noch 1 Stunde nachbeatmet, bevor die Anästhesie beendet, und die Tiere bei einsetzender Spontanatmung extubiert wurden. Die Tiere der Kontroll- Gruppen wurden weder anästhesiert noch katheterisiert. Alle Tiere wurden präoperativ an den Tagen -2 und -1, sowie postoperativ an den Tagen 1, 2, 3 und 14 neurologisch untersucht. Die neurokognitiven Funktion wurde mit dem modifizierten Zylinder Hole Board Test (mZHBT) postoperativ täglich vom 4. bis einschließlich 13. Tag getestet. Am 14. postoperativen Tag wurden die Ratten dann in tiefer Isoflurannarkose entblutet, die Gehirne entnommen und tiefgefroren (- 80 °C). Hämatoxylin-Eosin- (HE-) gefärbte Gehirnschnitte aus den Arealen Striatum (Bregma - 0,3 mm), Kortex und Hippokampus (Bregma - 3,3 mm) wurden hinsichtlich intakter und geschädigter Neurone unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Daten wurden mittels allgemeiner linearer Modelle mit post hoc einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferroni t-Tests bzw. Kruskal-Wallis und post hoc Mann-Whitney U ($p < 0,05$) ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die postoperative kognitive Funktion und das Verhalten bei männlichen und weiblichen Tieren ähnlich waren. Die motorische Funktion war bei den weiblichen Tieren tendenziell besser, sofern sie die frühe postoperative Phase überlebt hatten. Der neuronale morphologische Gesamtschaden war bei den weiblichen Tieren signifikant geringer ausgeprägt als bei den männlichen Tieren. Während der Durchführung der Studie zeigte sich insbesondere bei den weiblich intakten Ratten während der ersten 4 postoperativen Tage eine erhöhte Mortalität. Da die Mortalität in der vorliegenden Studie kein Untersuchungsziel war, erweist sich auch die Gruppengröße zu gering um statistisch relevante Aussagen zu treffen. Darüber hinaus konnten die Organe der vorzeitig verstorbenen Tiere für weitere Analysen im Sinne einer Ursachenforschung nicht rechtzeitig entnommen werden. Aus diesen Gründen müssen nachfolgend weiterführende Untersuchungen diesen Zufallsbefund zu klären versuchen.

7 Summary

Influence of gender and hormonal status on neurologic and neurocognitive function and on brain morphology 14 days after heart-surgery-characteristic cardiopulmonary bypass with 45 min of deep hypothermic circulatory arrest in the rat

Aim of this study was to investigate the influence of gender and sex hormone status on neurocognitive function and neuronal morphology 14 days after heart-surgery-characteristic cardiopulmonary bypass (CPB) with 45 min of deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) in female and male intact and neutered rats.

40 male and 40 female rats of the same age were randomized into 2 groups: 40 rats were subjected to CPB with DHCA and neurocognitive function was tested over 14 days following DHCA. 40 animals served as control groups and were assessed for neurocognitive function only. In both groups, “DHCA” as well as “Controls”, 20 rats were neutered, 20 rats remained intact. 4 weeks after neutering, rats in the DHCA group were anesthetized (2.0 – 2.5 Vol % in 40 % O₂) intubated, catheterized, connected to CPB and cooled down to a rectal temperature of 15 – 18 °C. CPB and ventilation was then stopped and DHCA was initiated. After 45 min of DHCA, CPB was reinstated and rats rewarmed back again over 40 min to a rectal temperature of 35.5 °C. After cessation of CPB, rats were ventilated for 1 hour, before anesthesia was terminated and rats were extubated once spontaneous breathing resumed. Rats of the control groups remained naive. All animals were tested for neurologic function on preoperative days 2 and 1 as well as 1, 2, 3 and 14 days after DHCA. Postoperative neurocognitive function was assessed daily, using the modified cylinder hole board test (mZHBT), starting at postoperative day 4 until postoperative day 13. On postoperative day 14 rats were anesthetized with isoflurane, exsanguinated, decapitated, the brains removed and snap frozen on dry ice (- 80 °C). Brains were serially cut and stained with hematoxylin and eosin. Striatum (Bregma -0.3 mm), Cortex and Hippocampus (Bregma -3.3 mm) were evaluated under a light microscope, by counting intact and damaged neurons for each region in each hemisphere. Data were analyzed using general linear models with post hoc one way analysis of variance and Bonferroni t-tests. Additionally, Kruskal-Wallis and post hoc Mann-Whitney U was used where appropriate ($p < 0.05$).

Results show that postoperative cognitive function and behavior were comparable between male and female groups. Motor function was better in female rats, independent of hormonal status, once they survived the early postoperative phase. Neuronal damage was significantly

less prominent in female groups, also independent of hormonal status. While performing the study, female normal rats showed a high drop out rate during the first 4 postoperative days. However, since the study was not designed to investigate mortality as a primary end point, the group size is too small to provide enough statistically relevant information concerning mortality. Additionally organs of the animals that did not survive the postoperative phase could not be harvested in due time to provide relevant analytical data concerning cause of death. Therefore this chance finding will warrant further investigation with mortality as principal aim.

8 Literaturverzeichnis

- ACS, P., KIPP, M., NORKUTE, A., JOHANN, S., CLARNER, T., BRAUN, A., BERENTE, Z., KOMOLY, S. & BEYER, C. 2009. 17beta-estradiol and progesterone prevent cuprizone provoked demyelination of corpus callosum in male mice. *Glia*, 57, 807-14.
- ADAMS, F. (Übers.) 1849. *The Genuine Works of Hippokrates.*, London, Sydenham Society.
- AGGARWAL, R., MEDHI, B., PATHAK, A., DHAWAN, V. & CHAKRABARTI, A. 2008. Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *J Pharm Pharmacol*, 60, 731-7.
- ALAM, M., LEE, V. V., ELAYDA, M. A., SHAHZAD, S. A., YANG, E. Y., NAMBI, V., JNEID, H., PAN, W., COULTER, S., WILSON, J. M., RAMANATHAN, K. B., BALLANTYNE, C. M. & VIRANI, S. S. 2012. Association of gender with morbidity and mortality after isolated coronary artery bypass grafting. A propensity score matched analysis. *Int J Cardiol*.
- ALKAYED, N. J., HARUKUNI, I., KIMES, A. S., LONDON, E. D., TRAYSTMAN, R. J. & HURN, P. D. 1998. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke*, 29, 159-65; discussion 166.
- ARDELT, A. A., MCCULLOUGH, L. D., KORACH, K. S., WANG, M. M., MUNZENMAIER, D. H. & HURN, P. D. 2005. Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model. *Stroke*, 36, 337-41.
- ARROWSMITH, J. E., GROCOTT, H. P., REVES, J. G. & NEWMAN, M. F. 2000. Central nervous system complications of cardiac surgery. *Br J Anaesth*, 84, 378-93.
- ATKINSON, R. S., R. 1968. *Human memory: a proposed system and its control processes*, New York, Academic Press.
- AZEVEDO, R. B., LACAVA, Z. G., MIYASAKA, C. K., CHAVES, S. B. & CURI, R. 2001. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. *Braz J Med Biol Res*, 34, 683-7.
- BADDELEY, A. 1996. The fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13468-72.
- BADDELEY, A. 1998. Working memory. *C R Acad Sci III*, 321, 167-73.
- BADDELEY, A. 2000. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci*, 4, 417-423.
- BADDELEY, A., CHINCOTTA, D., STAFFORD, L. & TURK, D. 2002. Is the word length effect in STM entirely attributable to output delay? Evidence from serial recognition. *Q J Exp Psychol A*, 55, 353-69.
- BADDELEY, A. & WILSON, B. A. 2002. Prose recall and amnesia: implications for the structure of working memory. *Neuropsychologia*, 40, 1737-43.

- BADDELEY, A. H., G. 1974. *Working memory*, New York, Academic Press.
- BEHL, C., SKUTELLA, T., LEZOUALC'H, F., POST, A., WIDMANN, M., NEWTON, C. J. & HOLSBOER, F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*, 51, 535-41.
- BERTI, S. 2010. Arbeitsgedächtnis: Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft eines theoretischen Konstruktes. *Psychologische Rundschau*, 61, 3-9.
- BINGHAM, D., MACRAE, I. M. & CARSWELL, H. V. 2005. Detrimental effects of 17beta-oestradiol after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 414-20.
- BOISSIER, J. R., SIMON, P. & LWOFF, J. M. 1964. [Use of a Particular Mouse Reaction (Hole Board Method) for the Study of Psychotropic Drugs]. *Therapie*, 19, 571-83.
- BOKESCH, P. M., MARCHAND, J., SEIRAFI, P. A., DEISS, J. M., WARNER, K. G., BRONSON, R. T. & KREAM, R. M. 1996. Immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology*, 85, 1439-46.
- BORGER, M. A., PENISTON, C. M., WEISEL, R. D., VASILIOU, M., GREEN, R. E. & FEINDEL, C. M. 2001. Neuropsychologic impairment after coronary bypass surgery: effect of gaseous microemboli during perfusionist interventions. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121, 743-9.
- BROCKHAUS-ENZYKLOPÄDIE 1998. *Brockhaus-Enzyklopädie, Band 8, Seite 151, Edition 20*, Bibliografisches Institut & FA Brockhaus AG, Mannheim.
- BROWN, J. 1958. Some tests of the decay theory of immediate memory. *Quart J Exp Psychol*, 10, 12-21.
- BRUCE-KELLER, A. J., KEELING, J. L., KELLER, J. N., HUANG, F. F., CAMONDOLA, S. & MATTSON, M. P. 2000. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*, 141, 3646-56.
- BUTLER, J., ROCKER, G. M. & WESTABY, S. 1993. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*, 55, 552-9.
- CALABRESE, P. & MARKOWITSCH, H. J. 2003. [Memory and brain--neurobiological correlates of memory disturbances]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 71, 211-9.
- CARWILE, E., WAGNER, A. K., CRAGO, E. & ALEXANDER, S. A. 2009. Estrogen and stroke: a review of the current literature. *J Neurosci Nurs*, 41, 18-25; quiz 26-7.
- CHANG, R. K., CHEN, A. Y. & KLITZNER, T. S. 2002. Female sex as a risk factor for in-hospital mortality among children undergoing cardiac surgery. *Circulation*, 106, 1514-22.
- CHEN, R., COHEN, L. G. & HALLETT, M. 2002. Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*, 111, 761-73.

- CHENG, J., ALKAYED, N. J. & HURN, P. D. 2007. Deleterious effects of dihydrotestosterone on cerebral ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1553-62.
- CLARK, R. E. & SQUIRE, L. R. 2010. An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia*, 48, 2234-44.
- CLEMENT, Y., PROESCHEL, M. F., BONDOUX, D., GIRARD, F., LAUNAY, J. M. & CHAPOUTHIER, G. 1997. Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. *Brain Res*, 752, 127-35.
- COMBS, D. J. & D'ALECY, L. G. 1987. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. *Stroke*, 18, 503-11.
- CONSTANTIN, S. 2011. Physiology of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurone: studies from embryonic GnRH neurones. *J Neuroendocrinol*, 23, 542-53.
- COOK, D. J. 2001. Cerebral hyperthermia and cardiac surgery: consequences and prevention. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 13, 176-83.
- CRABBE, J. C. 1986. Genetic differences in locomotor activation in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 25, 289-92.
- DAVIS, M. 1974. Sensitization of the rat startle response by noise. *J Comp Physiol Psychol*, 87, 571-81.
- DEGRABA, T. J., OSTROW, P., HANSON, S. & GROTTA, J. C. 1994. Motor performance, histologic damage, and calcium influx in rats treated with NBQX after focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14, 262-8.
- DENNIS, C., SPRENG, D. S., JR., NELSON, G. E., KARLSON, K. E., NELSON, R. M., THOMAS, J. V., EDER, W. P. & VARCO, R. L. 1951. Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs; an apparatus applicable to human patients, and application to one case. *Ann Surg*, 134, 709-21.
- DIXON, C. E., LYETH, B. G., POVLISHOCK, J. T., FINDLING, R. L., HAMM, R. J., MARMAROU, A., YOUNG, H. F. & HAYES, R. L. 1987. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg*, 67, 110-9.
- DU PLESSIS, A. J. 1997. Cerebral hemodynamics and metabolism during infant cardiac surgery. Mechanisms of injury and strategies for protection. *J Child Neurol*, 12, 285-300.
- DUBAL, D. B. & WISE, P. M. 2001. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology*, 142, 43-8.
- DUBAL, D. B., ZHU, H., YU, J., RAU, S. W., SHUGHRUE, P. J., MERCHENTHALER, I., KINDY, M. S. & WISE, P. M. 2001. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1952-7.
- DURHAM, J. L., JORDAN, K. A., DEVOS, M. J., WILLIAMS, E. K. & SANDSTROM, N. J. 2012. Estradiol protects against hippocampal damage and impairments in fear conditioning resulting from transient global ischemia in mice. *Brain Res*, 1443, 64-74.

- EDWARDS, F. H., CAREY, J. S., GROVER, F. L., BERO, J. W. & HARTZ, R. S. 1998. Impact of gender on coronary bypass operative mortality. *Ann Thorac Surg*, 66, 125-31.
- ELKIN, B. S., ILANKOVAN, A. & MORRISON, B., 3RD 2010. Age-dependent regional mechanical properties of the rat hippocampus and cortex. *J Biomech Eng*, 132, 011010.
- EMMELOT-VONK, M. H., VERHAAR, H. J., NAKHAI POUR, H. R., ALEMAN, A., LOCK, T. M., BOSCH, J. L., GROBBEE, D. E. & VAN DER SCHOUW, Y. T. 2008. Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other parameters in older men: a randomized controlled trial. *Jama*, 299, 39-52.
- EMMERT, M. Y., SALZBERG, S. P., SEIFERT, B., SCHURR, U. P., ODAVIC, D., REUTHEBUCH, O. & GENONI, M. 2010. Despite modern off-pump coronary artery bypass grafting women fare worse than men. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 10, 737-41.
- FEENEY, D. M., GONZALEZ, A. & LAW, W. A. 1982. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*, 217, 855-7.
- FERRARIS, V. A., FERRARIS, S. P., SAHA, S. P., HESSEL, E. A., 2ND, HAAN, C. K., ROYSTON, B. D., BRIDGES, C. R., HIGGINS, R. S., DESPOTIS, G., BROWN, J. R., SPIESS, B. D., SHORE-LESSERSON, L., STAFFORD-SMITH, M., MAZER, C. D., BENNETT-GUERRERO, E., HILL, S. E. & BODY, S. 2007. Perioperative blood transfusion and blood conservation in cardiac surgery: the Society of Thoracic Surgeons and The Society of Cardiovascular Anesthesiologists clinical practice guideline. *Ann Thorac Surg*, 83, S27-86.
- FILE, S. E. 1973. Effects of chlorpromazine on exploration and habituation in the rat. *Br J Pharmacol*, 49, 303-10.
- FILE, S. E. & POPE, J. H. 1974. The action of chlorpromazine on exploration in pairs of rats. *Psychopharmacologia*, 37, 249-54.
- FILE, S. E. & WARDILL, A. G. 1975. The reliability of the hole-board apparatus. *Psychopharmacologia*, 44, 47-51.
- FOLKERTH, T. L., ANGELL, W. W., FOSBURG, R. G. & OURY, J. H. 1975. Effect of deep hypothermia, limited cardiopulmonary bypass, and total arrest on growing puppies. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 10, 411-21.
- FOLSOM, A. R., WU, K. K., DAVIS, C. E., CONLAN, M. G., SORLIE, P. D. & SZKLO, M. 1991. Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, 91, 191-205.
- FRASSETTO, L. & SEBASTIAN, A. 1996. Age and systemic acid-base equilibrium: analysis of published data. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 51, B91-9.
- FRYE, C. A. & WALF, A. A. 2008 (a). Effects of progesterone administration and APPswe+PSEN1Deltae9 mutation for cognitive performance of mid-aged mice. *Neurobiol Learn Mem*, 89, 17-26.

- FRYE, C. A. & WALF, A. A. 2008 (b). Progesterone to ovariectomized mice enhances cognitive performance in the spontaneous alternation, object recognition, but not placement, water maze, and contextual and cued conditioned fear tasks. *Neurobiol Learn Mem*, 90, 171-7.
- FUJIMOTO, S. T., LONGHI, L., SAATMAN, K. E., CONTE, V., STOCCHETTI, N. & MCINTOSH, T. K. 2004. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 365-78.
- FUNK, G. C. 2007. [Stewart's acid-base approach]. *Wien Klin Wochenschr*, 119, 390-403.
- GAO, L., TAHA, R., GAUVIN, D., OTHMEN, L. B., WANG, Y. & BLAISE, G. 2005. Postoperative cognitive dysfunction after cardiac surgery. *Chest*, 128, 3664-70.
- GERMANO, A. F., DIXON, C. E., D'AVELLA, D., HAYES, R. L. & TOMASELLO, F. 1994. Behavioral deficits following experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Neurotrauma*, 11, 345-53.
- GIBBON, J. H., JR. 1954. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med*, 37, 171-85; passim.
- GIBBS, R. B. & GABOR, R. 2003. Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. *J Neurosci Res*, 74, 637-43.
- GIBSON, C. L., CONSTANTIN, D., PRIOR, M. J., BATH, P. M. & MURPHY, S. P. 2005. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 193, 522-30.
- GINSBERG, M. D. & BUSTO, R. 1989. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20, 1627-42.
- GOLANI, I. K., N.; DRAI, D. 1999. Phenotyping stereotypic behavior: collective variables, range of variation and predictability. *Appl Animal Behav Sci*, 65, 191-220.
- GORDAN, M. L., JUNGWIRTH, B., OHL, F., KELLERMANN, K., KOCHS, E. F. & BLOBNER, M. 2012. Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. *Behav Brain Res*, 235, 7-20.
- GORODESKI, G. I. 2002. Update on cardiovascular disease in post-menopausal women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 16, 329-55.
- GREELEY, W. J., KERN, F. H., UNGERLEIDER, R. M., BOYD, J. L., 3RD, QUILL, T., SMITH, L. R., BALDWIN, B. & REVES, J. G. 1991. The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 101, 783-94.
- GROCOTT, H. P., HOMI, H. M. & PUSKAS, F. 2005. Cognitive dysfunction after cardiac surgery: revisiting etiology. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 9, 123-9.

GURU, V., FREMES, S. E., AUSTIN, P. C., BLACKSTONE, E. H. & TU, J. V. 2006. Gender differences in outcomes after hospital discharge from coronary artery bypass grafting. *Circulation*, 113, 507-16.

GV SOLAS GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE 1988. *Planung und struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen*, Biberach an der Riß, Verlag GV-SOLAS.

HALL, C. S. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18, 385-403.

HARUKUNI, I., HURN, P. D. & CRAIN, B. J. 2001. Deleterious effect of beta-estradiol in a rat model of transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 900, 137-42.

HAWK, T., ZHANG, Y. Q., RAJAKUMAR, G., DAY, A. L. & SIMPKINS, J. W. 1998. Testosterone increases and estradiol decreases middle cerebral artery occlusion lesion size in male rats. *Brain Res*, 796, 296-8.

HAYASHI, T., YAMADA, K., ESAKI, T., KUZUYA, M., SATAKE, S., ISHIKAWA, T., HIDAKA, H. & IGUCHI, A. 1995. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun*, 214, 847-55.

HERSON, P. S., KOERNER, I. P. & HURN, P. D. 2009. Sex, sex steroids, and brain injury. *Semin Reprod Med*, 27, 229-39.

HODGES, H. 1996. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res*, 3, 167-81.

HOGUE, C. W., FUCETOLA, R., HERSHEY, T., FREEDLAND, K., DAVILA-ROMAN, V. G., GOATE, A. M. & THOMPSON, R. E. 2008. Risk factors for neurocognitive dysfunction after cardiac surgery in postmenopausal women. *Ann Thorac Surg*, 86, 511-6.

HOGUE, C. W., JR., FREEDLAND, K., HERSHEY, T., FUCETOLA, R., NASSIEF, A., BARZILAI, B., THOMAS, B., BIRGE, S., DIXON, D., SCHECHTMAN, K. B. & DAVILA-ROMAN, V. G. 2007. Neurocognitive outcomes are not improved by 17beta-estradiol in postmenopausal women undergoing cardiac surgery. *Stroke*, 38, 2048-54.

HORN, F. L., G.; MOC, I. 2003. *Biochemie des Menschen*, Stuttgart, G. Thieme Verlag.

HORSTMAN, A. M., DILLON, E. L., URBAN, R. J. & SHEFFIELD-MOORE, M. 2012. The Role of Androgens and Estrogens on Healthy Aging and Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.

HULLEY, S., GRADY, D., BUSH, T., FURBERG, C., HERRINGTON, D., RIGGS, B. & VITTINGHOFF, E. 1998. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, 280, 605-13.

HURN, P. D., VANNUCCI, S. J. & HAGBERG, H. 2005. Adult or perinatal brain injury: does sex matter? *Stroke*, 36, 193-5.

- JENESON, A. & SQUIRE, L. R. 2012. Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learn Mem*, 19, 15-25.
- JESMIN, S., HATTORI, Y., SAKUMA, I., LIU, M. Y., MOWA, C. N. & KITABATAKE, A. 2003. Estrogen deprivation and replacement modulate cerebral capillary density with vascular expression of angiogenic molecules in middle-aged female rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 181-9.
- JUNGWIRTH, B., ECKEL, B., BLOBNER, M., KELLERMANN, K., KOCHS, E. F. & MACKENSEN, G. B. 2009. The impact of cardiopulmonary bypass on systemic interleukin-6 release, cerebral nuclear factor-kappa B expression, and neurocognitive outcome in rats. *Anesth Analg*, 110, 312-20.
- JUNGWIRTH, B., KELLERMANN, K., BLOBNER, M., SCHMEHL, W., KOCHS, E. F. & MACKENSEN, G. B. 2007. Cerebral air emboli differentially alter outcome after cardiopulmonary bypass in rats compared with normal circulation. *Anesthesiology*, 107, 768-75.
- JUNGWIRTH, B., KELLERMANN, K., QING, M., MACKENSEN, G. B., BLOBNER, M. & KOCHS, E. F. 2009. Cerebral tumor necrosis factor alpha expression and long-term neurocognitive performance after cardiopulmonary bypass in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 138, 1002-7.
- JUNGWIRTH, B., MACKENSEN, G. B., BLOBNER, M., NEFF, F., REICHART, B., KOCHS, E. F. & NOLLERT, G. 2006. Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 131, 805-12.
- KELLERMANN, K., DERTINGER, N., BLOBNER, M., KEES, F., KOCHS, E. F. & JUNGWIRTH, B. 2010. Perioperative moxifloxacin treatment in rats subjected to deep hypothermic circulatory arrest: reduction in cerebral inflammation but without improvement in cognitive performance. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 141, 796-802.
- KELLERMANN, K., GORDAN, M. L., NOLLERT, G., BLOBNER, M., KOCHS, E. F. & JUNGWIRTH, B. 2009. Long-term assessment of NFkappaB expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats. *Perfusion*, 24, 429-36.
- KESNER, R. P. 1985. Correspondence between humans and animals in coding of temporal attributes: role of hippocampus and prefrontal cortex. *Ann N Y Acad Sci*, 444, 122-36.
- KESNER, R. P., DIMATTIA, B. V. & CRUTCHER, K. A. 1987. Evidence for neocortical involvement in reference memory. *Behav Neural Biol*, 47, 40-53.
- KIPP, M. & BEYER, C. 2009. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. *Front Neuroendocrinol*, 30, 188-200.
- KIPP, M., KARAKAYA, S., PAWLAK, J., ARAUJO-WRIGHT, G., ARNOLD, S. & BEYER, C. 2006. Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors. *Front Neuroendocrinol*, 27, 376-90.

- KIRKLIN, J. W., DONALD, D. E., HARSHBARGER, H. G., HETZEL, P. S., PATRICK, R. T., SWAN, H. J. & WOOD, E. H. 1956. Studies in extracorporeal circulation. I. Applicability of Gibbon-type pump-oxygenator to human intracardiac surgery: 40 cases. *Ann Surg*, 144, 2-8.
- KREUTZIG, T. 2002. *Kurzlehrbuch Biochemie*, München, Urban & Fischer Verlag.
- LAFHEY, J. G., BOYLAN, J. F. & CHENG, D. C. 2002. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology*, 97, 215-52.
- LEBESGUE, D., CHEVALEYRE, V., ZUKIN, R. S. & ETGEN, A. M. 2009. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*, 74, 555-61.
- LEE, A. J., LOWE, G. D., SMITH, W. C. & TUNSTALL-PEDOE, H. 1993. Plasma fibrinogen in women: relationships with oral contraception, the menopause and hormone replacement therapy. *Br J Haematol*, 83, 616-21.
- LIU, M., KELLEY, M. H., HERSON, P. S. & HURN, P. D. 2010. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol*, 35, 127-43.
- LORENZ, K. 1935. Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. *Journal für Ornithologie*, 83, 289-413.
- MACKENSEN, G. B., TI, L. K., PHILLIPS-BUTE, B. G., MATHEW, J. P., NEWMAN, M. F., GROCOTT, H. P. & NEUROLOGIC OUTCOME RESEARCH, G. 2003. Cerebral embolization during cardiac surgery: impact of aortic atheroma burden. *Br J Anaesth*, 91, 656-61.
- MAULT, J. R., OHTAKE, S., KLINGENSMITH, M. E., HEINLE, J. S., GREELEY, W. J. & UNGERLEIDER, R. M. 1993. Cerebral metabolism and circulatory arrest: effects of duration and strategies for protection. *Ann Thorac Surg*, 55, 57-63; discussion 63-4.
- MCEWEN, B. S. & SAPOLSKY, R. M. 1995. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 205-16.
- MELCANGI, R. C. & MENSAH-NYAGAN, A. G. 2008. Neurosteroids: measurement and pathophysiologic relevance. *Neurochem Int*, 52, 503-5.
- MERCHENTHALER, I., DELLOVADE, T. L. & SHUGHRUE, P. J. 2003. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1007, 89-100.
- MORRIS, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11, 47-60.
- NAKANO, T., HURN, P. D., HERSON, P. S. & TRAYSTMAN, R. J. 2010. Testosterone exacerbates neuronal damage following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mouse. *Brain Res*, 1357, 124-30.

- NEWMAN, M. F., KIRCHNER, J. L., PHILLIPS-BUTE, B., GAVER, V., GROCOTT, H., JONES, R. H., MARK, D. B., REVES, J. G., BLUMENTHAL, J. A., NEUROLOGICAL OUTCOME RESEARCH, G. & THE CARDIOTHORACIC ANESTHESIOLOGY RESEARCH ENDEAVORS, I. 2001. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*, 344, 395-402.
- NIJBOER, C. H., KAVELAARS, A., VAN BEL, F., HEIJNEN, C. J. & GROENENDAAL, F. 2007. Gender-dependent pathways of hypoxia-ischemia-induced cell death and neuroprotection in the immature P3 rat. *Dev Neurosci*, 29, 385-92.
- NURMI, A., LINDSBERG, P. J., KOISTINAHO, M., ZHANG, W., JUETTLER, E., KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L., WEIH, F., FRANK, N., SCHWANINGER, M. & KOISTINAHO, J. 2004. Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke*, 35, 987-91.
- NUSSMEIER, N. A., MARINO, M. R. & VAUGHN, W. K. 2002. Hormone replacement therapy is associated with improved survival in women undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124, 1225-9.
- OATES, R. K., SIMPSON, J. M., TURNBULL, J. A. & CARTMILL, T. B. 1995. The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 110, 786-92.
- OHL, F. & FUCHS, E. 1999. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Res Cogn Brain Res*, 7, 379-87.
- OHL, F., HOLSBOER, F. & LANDGRAF, R. 2001 (a). The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput*, 33, 392-7.
- OHL, F. & KECK, M. E. 2003. Behavioural screening in mutagenised mice--in search for novel animal models of psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*, 480, 219-28.
- OHL, F., OITZL, M. S. & FUCHS, E. 1998. Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. *J Neurosci Methods*, 81, 35-40.
- OHL, F., TOSCHI, N., WIGGER, A., HENNIGER, M. S. & LANDGRAF, R. 2001 (b). Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci*, 115, 429-36.
- OZACMAK, V. H. & SAYAN, H. 2009. The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiol Res*, 58, 909-12.
- PAN, D. S., LIU, W. G., YANG, X. F. & CAO, F. 2007. Inhibitory effect of progesterone on inflammatory factors after experimental traumatic brain injury. *Biomed Environ Sci*, 20, 432-8.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, New York
- PERLMAN, J. M. 2004. Brain injury in the term infant. *Semin Perinatol*, 28, 415-24.

POLLANEN, E., SIPILA, S., ALEN, M., RONKAINEN, P. H., ANKARBERG-LINDGREN, C., PUOLAKKA, J., SUOMINEN, H., HAMALAINEN, E., TURPEINEN, U., KONTTINEN, Y. T. & KOVANEN, V. 2011. Differential influence of peripheral and systemic sex steroids on skeletal muscle quality in pre- and postmenopausal women. *Aging Cell*, 10, 650-60.

POZZI, S., BENEDUSI, V., MAGGI, A. & VEGETO, E. 2006. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1089, 302-23.

PRUT, L. & BELZUNG, C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*, 463, 3-33.

PULSINELLI, W. A., BRIERLEY, J. B. & PLUM, F. 1982. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 11, 491-8.

RANUCCI, M., PAZZAGLIA, A., BIANCHINI, C., BOZZETTI, G. & ISGRO, G. 2008. Body size, gender, and transfusions as determinants of outcome after coronary operations. *Ann Thorac Surg*, 85, 481-6.

ROACH, G. W., KANCHUGER, M., MANGANO, C. M., NEWMAN, M., NUSSMEIER, N., WOLMAN, R., AGGARWAL, A., MARSCHALL, K., GRAHAM, S. H. & LEY, C. 1996. Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators. *N Engl J Med*, 335, 1857-63.

ROMEIS, B., MULISCH, M. & WELSCH, U. H. 2010. *ROMEIS- Mikroskopische Technik*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

ROOF, R. L. & HALL, E. D. 2000. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma*, 17, 367-88.

ROSAMOND, W., FLEGAL, K., FRIDAY, G., FURIE, K., GO, A., GREENLUND, K., HAASE, N., HO, M., HOWARD, V., KISSELA, B., KITTNER, S., LLOYD-JONES, D., MCDERMOTT, M., MEIGS, J., MOY, C., NICHOL, G., O'DONNELL, C. J., ROGER, V., RUMSFELD, J., SORLIE, P., STEINBERGER, J., THOM, T., WASSERTHIEL-SMOLLER, S. & HONG, Y. 2007. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 115, e69-171.

ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R. L., LACROIX, A. Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M. L., JACKSON, R. D., BERESFORD, S. A., HOWARD, B. V., JOHNSON, K. C., KOTCHEN, J. M. & OCKENE, J. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 288, 321-33.

ROTHBLAT, L. A., VNEK, N., GLEASON, T. C. & KROMER, L. F. 1993. Role of the parahippocampal region in spatial and non-spatial memory: effects of parahippocampal lesions on rewarded alternation and concurrent object discrimination learning in the rat. *Behav Brain Res*, 55, 93-100.

- ROTHOERL, R. D. & BRAWANSKI, A. 2006. The history and present status of deep hypothermia and circulatory arrest in cerebrovascular surgery. *Neurosurg Focus*, 20, E5.
- SAHAKIAN, B. J., MORRIS, R. G., EVENDEN, J. L., HEALD, A., LEVY, R., PHILPOT, M. & ROBBINS, T. W. 1988. A comparative study of visuospatial memory and learning in Alzheimer-type dementia and Parkinson's disease. *Brain*, 111 (Pt 3), 695-718.
- SAWADA, M., ALKAYED, N. J., GOTO, S., CRAIN, B. J., TRAYSTMAN, R. J., SHAIVITZ, A., NELSON, R. J. & HURN, P. D. 2000. Estrogen receptor antagonist ICI182,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 112-8.
- SHANN, K. G., LIKOSKY, D. S., MURKIN, J. M., BAKER, R. A., BARIBEAU, Y. R., DEFOE, G. R., DICKINSON, T. A., GARDNER, T. J., GROCCOTT, H. P., O'CONNOR, G. T., ROSINSKI, D. J., SELLKE, F. W. & WILLCOX, T. W. 2006. An evidence-based review of the practice of cardiopulmonary bypass in adults: a focus on neurologic injury, glycemic control, hemodilution, and the inflammatory response. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 132, 283-90.
- SHOCK, N. W. & HASTINGS, A. B. 1934. Studies of the acid-base balance of the blood. III. Variation in the acid-base balance of the blood in normal individuals. *Journal of Biological Chemistry*, 104, 585-600.
- SKINNER, B. F. 1930. On the Conditions of Elicitation of Certain Eating Reflexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16, 433-8.
- SQUIRE, L. R. 1992. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev*, 99, 195-231.
- SQUIRE, L. R. 2009. Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci*, 29, 12711-6.
- SQUIRE, L. R. & ZOLA, S. M. 1998. Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus*, 8, 205-11.
- STECKLER, T. & MUIR, J. L. 1996. Measurement of cognitive function: relating rodent performance with human minds. *Brain Res Cogn Brain Res*, 3, 299-308.
- STIRONE, C., BOROUJERDI, A., DUCKLES, S. P. & KRAUSE, D. N. 2005. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol Pharmacol*, 67, 105-13.
- SUZUKI, S., GERHOLD, L. M., BOTTFNER, M., RAU, S. W., DELA CRUZ, C., YANG, E., ZHU, H., YU, J., CASHION, A. B., KINDY, M. S., MERCHENTHALER, I., GAGE, F. H. & WISE, P. M. 2007. Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. *J Comp Neurol*, 500, 1064-75.
- TANZER, L. & JONES, K. J. 1997. Gonadal steroid regulation of hamster facial nerve regeneration: effects of dihydrotestosterone and estradiol. *Exp Neurol*, 146, 258-64.

- TOEPPER, M., GEBHARDT, H., BEBLO, T., THOMAS, C., DRIESSEN, M., BISCHOFF, M., BLECKER, C. R., VAITL, D. & SAMMER, G. 2010. Functional correlates of distractor suppression during spatial working memory encoding. *Neuroscience*, 165, 1244-53.
- TRIGGIANI, E., COPPOLA, M., NIGRO, R., NAPOLI, V. & BELLINI, O. 1970. [Extracorporeal circulation in the rat. Technical aspects]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 46, 998-1001.
- TULVING, E. & MARKOWITSCH, H. J. 1998. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8, 198-204.
- TUPPER, D. E. & WALLACE, R. B. 1980. Utility of the neurological examination in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 40, 999-1003.
- VACCARINO, V., ABRAMSON, J. L., VELEDAR, E. & WEINTRAUB, W. S. 2002. Sex differences in hospital mortality after coronary artery bypass surgery: evidence for a higher mortality in younger women. *Circulation*, 105, 1176-81.
- VAN DEN BERGHE, G. 2007. Does tight blood glucose control during cardiac surgery improve patient outcome? *Ann Intern Med*, 146, 307-8.
- VEGETO, E., BENEDUSI, V. & MAGGI, A. 2008. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol*, 29, 507-19.
- WEHBERG, K. E., FOSTER, A. H., WISE, R. M., MCLAUGHLIN, J. S. & BRUNNER, M. J. 1996. Nitric oxide mediates fluid accumulation during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 112, 168-74.
- WEISCHER, M. L. 1976. [A simple device for measuring exploratory activity and motility in mice (author's transl)]. *Psychopharmacology (Berl)*, 50, 275-9.
- WEN, Y., YANG, S., LIU, R., PEREZ, E., YI, K. D., KOULEN, P. & SIMPKINS, J. W. 2004. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. *Brain Res*, 1008, 147-54.
- WOODHALL, B., SEALY, W. C., HALL, K. D. & FLOYD, W. L. 1960. Craniotomy under conditions of quinidine-protected cardioplegia and profound hypothermia. *Ann Surg*, 152, 37-44.
- WOODS, S. E., NOBLE, G., SMITH, J. M. & HASSELFELD, K. 2003. The influence of gender in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: an eight-year prospective hospitalized cohort study. *J Am Coll Surg*, 196, 428-34.
- WOOLLEY, C. S., GOULD, E., FRANKFURT, M. & MCEWEN, B. S. 1990. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, 10, 4035-9.

YANG, S. H., LIU, R., WU, S. S. & SIMPKINS, J. W. 2003. The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci*, 1007, 101-7.

YANG, S. H., PEREZ, E., CUTRIGHT, J., LIU, R., HE, Z., DAY, A. L. & SIMPKINS, J. W. 2002. Testosterone increases neurotoxicity of glutamate in vitro and ischemia-reperfusion injury in an animal model. *J Appl Physiol*, 92, 195-201.

ZHENG, P. 2009. Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Prog Neurobiol*, 89, 134-52.

ZOLA-MORGAN, S. & SQUIRE, L. R. 1993. Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci*, 16, 547-63.

ZOLA-MORGAN, S. M. & SQUIRE, L. R. 1990. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*, 250, 288-90.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 01:	Randomisierungsschema der Lochkombinationen für die Futterbelohnung im mZHB	55
Tabelle 02:	Mittlere (\pm STABW) parametrische physiologische Befunde der DHCA- Gruppen vor, während und nach EKZ und DHCA zu den definierten Messzeitpunkten	66
Tabelle 03(a):	Mittlere (\pm STABW) Geschlechtshormonkonzentration im Serum der DHCA- Gruppen an Tag 14 nach EKZ und DHCA	67
Tabelle 03(b):	Mittlere (\pm STABW) Geschlechtshormonkonzentration im Serum der Kontrollgruppen an Tag 14 nach EKZ und DHCA	68
Tabelle 04:	Prä-, peri-, und postoperatives mittleres (\pm STABW) Körpergewicht in g der DHCA- Gruppen	70
Tabelle 05:	Prä-, peri-, und postoperatives mittleres (\pm STABW) Körpergewicht in g der DHCA- Gruppen	70
Tabelle 06:	Mittleres (\pm STABW) Punktegesamtergebnis (Score) der Sensorikbeurteilung der DHCA- Gruppen	75
Tabelle 07:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlritte beim Beam Walking- Test der DHCA- Gruppen	77
Tabelle 08:	Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam Balance- Test der DHCA- Gruppen	79
Tabelle 09:	Mittlere (\pm STABW) Greif- Haltezeit (s) beim Prehensile Traction- Test der DHCA- Gruppen	81
Tabelle 10:	Mittlere (\pm STABW) Haltezeit (s) beim Rotating Grid- Test der DHCA- Gruppen	83
Tabelle 11:	Mittlere (\pm STABW) Durchlaufgesamtzeit (s) beim mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	85
Tabelle 12:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlbesuche im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	87
Tabelle 13:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Auslassungsfehler im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	89
Tabelle 14:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Wiederholungsfehler im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	91
Tabelle 15:	Mittlere (\pm STABW) Fresszeit (s) im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	93
Tabelle 16:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der frustranen Lochbesuche im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	95
Tabelle 17:	Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Boardbesuch im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	97
Tabelle 18:	Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	99
Tabelle 19:	Mittlere (\pm STABW) auf dem Board verbrachte Zeit (%) im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	101
Tabelle 20:	Mittlere (\pm STABW) Immobilität (s) im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13	103

Tabelle 21:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Besuche befüllter Zylinder im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13.....	105
Tabelle 22:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Boardbesuche im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13.....	107
Tabelle 23:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Gruppenkontakte im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13.....	109
Tabelle 24:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Rearings im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13.....	111
Tabelle 25:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Putzphasen im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13.....	113
Tabelle 26:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Linienquerungen im mZHBT der DHCA- Gruppen an den Tagen 4 bis 13.....	115
Tabelle 27:	Mittleres (\pm STABW) Punktegesamtergebnis (Score) der Histologischen Schadensbewertung von Neuronen der vier DHCA- Gruppen an Tag 14.....	118

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01:	Schematische Darstellung des Multikomponentenmodells des Kurz- bzw. Arbeitsgedächtnisses.....	4
Abbildung 02:	Schematische Darstellung des Langzeitgedächtnisses mit zugeordneten anatomischen Strukturen.....	6
Abbildung 03:	Schematische Darstellung (exemplarisch) einer Open- Field- Testanordnung.....	10
Abbildung 04:	Schematische Aufsicht auf die Morris- Water- Maze- Testanordnung.....	11
Abbildung 05:	Schematische Darstellung zum Aufbau des modifizierten Zylinder Hole Board Tests.....	12
Abbildung 06:	Schematische Darstellung der Regulation der Ausschüttung der Geschlechtshormone.....	20
Abbildung 07:	Zeitplan (d) des Versuchsablaufs von der Ankunft der Tiere bis zum Ende der Versuchsphase.....	31
Abbildung 08:	Schema Versuchsgruppeneinteilung.....	32
Abbildung 09:	Versuchsaufbau EKZ (schematisch).....	38
Abbildung 10:	Versuchsaufbau EKZ (im)Foto.....	38
Abbildung 11:	Ratte im Beam Walking- Test.....	44
Abbildung 12:	Ratte im Rotating Grid- Test.....	45
Abbildung 13:	Ratte im Beam Balance- Test.....	46
Abbildung 14:	Ratte im Prehensile Traction- Test.....	47
Abbildung 15:	Formblatt zur Dokumentation der Befunde der neurologischen Untersuchungen.....	49
Abbildung 16:	Ausstattung des mZHBT- Arbeitsplatzes.....	51
Abbildung 17:	Haltungskäfig mit integrierter Testarena.....	52
Abbildung 18:	Modifiziertes Zylinder Hole Board mit 10 nummerierten Zylindern im Foto.....	52
Abbildung 19:	Formblatt zur Registrierung der Aktionen von Ratten im mZHBT.....	59
Abbildung 20:	Beispiele für HE- gefärbte histologische Schnitte aus den drei relevanten Hirnbereichen: Hippokampus, Kortex und Striatum.....	62
Abbildung 21:	Mittleres Körpergewicht in g (\pm STABW) der DHCA- Gruppen im zeitlichen Verlauf (A) und als Gesamtmittelwert über 14 Tage (B) sowie der Kontrollgruppen im zeitlichen Verlauf (C) und als Gesamtmittelwert über 14 Tage (D).....	71
Abbildung 22:	Flowchart- Darstellung der Mortalität in der Gruppe der DHCA- Tiere.....	73
Abbildung 23:	Flowchart- Darstellung der Mortalität in der Gruppe der Kontrolltiere.....	74
Abbildung 24:	Mittleres (\pm STABW) Punktegesamtergebnis der Sensorikbeurteilung : (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.....	76
Abbildung 25:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlritte beim Beam Walking- Test : (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.....	78

Abbildung 26:	Mittlere (\pm STABW) Verweildauer (s) beim Beam Balance- Test : (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.....	80
Abbildung 27:	Mittlere (\pm STABW) Greif- Haltezeit (s) beim Prehensile Traction- Test : (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.....	82
Abbildung 28:	Mittlere (\pm STABW) Haltezeit (s) beim Rotating Grid- Test : (A) zeitlicher Verlauf über 14 Tage nach DHCA und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum 14 Tage.....	84
Abbildung 29:	Mittlere (\pm STABW) Durchlaufgesamtzeit (s) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	86
Abbildung 30:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Fehlbesuche im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	88
Abbildung 31:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Auslassungsfehler im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	90
Abbildung 32:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Wiederholungsfehler im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	92
Abbildung 33:	Mittlere (\pm STABW) Fresszeit (s) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	94
Abbildung 34:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der frustranen Lochbesuche im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	96
Abbildung 35:	Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Boardbesuch im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	98
Abbildung 36:	Mittlere (\pm STABW) Latenzzeit (s) bis zum ersten Besuch eines befüllten Zylinders im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	100
Abbildung 37:	Mittlere (\pm STABW) auf dem Board verbrachte Zeit (%) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	102

Abbildung 38:	Mittlere (\pm STABW) Immobilität (s) im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	104
Abbildung 39:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Besuche befüllter Zylinder im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	106
Abbildung 40:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Boardbesuche im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	108
Abbildung 41:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Gruppenkontakte im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	110
Abbildung 42:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Rearings im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	112
Abbildung 43:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Putzphasen im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.	114
Abbildung 44:	Mittlere (\pm STABW) Anzahl (nr) der Linienquerungen im mZHBT: (A) Darstellung des Verlaufs und (B) Box Plot Darstellung des Gesamtmittelwerts über den gesamten Untersuchungszeitraum nach DHCA.....	116
Abbildung 45:	Box Plot Darstellung des hirnmorphologischen Gesamtscores an Tag 14 nach EKZ mit DHCA.....	118

11 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
Bcl-2	B-cell-Lymphoma-2
BE	Base excess; Basenüberschuss
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CA	cornu ammonis, Ammonshorn
CMRO ₂	cerebral metabolic rate for oxygen, metabolische Sauerstoffrate im Gehirn
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Zyklooxygenase-2
CPAP	continuous positive airway pressure, kontinuierliche positive Beatmung
CPB	cardiopulmonary bypass, cardiopulmonaler Bypass
d	Tag
DHCA	deep hypothermic circulatory arrest, tief hypothermer Kreislaufstillstand
dl	Deziliter
EKG	Elektrokardiographie
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
eNOS	endotheliale Stickoxid-Synthase
ER (α; β)	Östrogenrezeptor (alpha; beta)
et al.	und andere
etc.	et cetera
etPaCO ₂	expiratorischer Kohlenstoffdioxidpartialdruck
evtl.	eventuell(e)
FiO ₂	Sauerstoffkonzentration
Fr	French
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G	Gramm
G	Gauge
gg.	gegen
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin- Eosin
Hkt	Hämatokrit
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPF	high power field, hoch vergrößertes Feld
H ₂ O	Wasser
I.E.	internationale Einheiten
IL-1β	Interleukin-1beta

iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
kg	Kilogramm
l	Liter
lat.	lateinisch
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Meter
mm	Millimeter
M.	Muskel
Mm.	Muskel (Mehrzahl)
MAC	mean alveolar concentration, mittlere alveoläre Konzentration
MAP	mean arterial pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
MCAO	middle cerebral artery occlusion, Verschluss der mittleren Hirnarterie
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Torr)
mmol	Millimol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MV	mean value, Mittelwert
MW	Mittelwert
mZHB	modifiziertes Zylinder Hole Board
mZHBT	modifizierter Zylinder Hole Board Test
Na ⁺	Natrium
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
NOS-2	Stickoxid-Synthase-2
NU	Neurologische Untersuchung
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
PaCO ₂	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PaO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Proc.	Prozess
Procc.	Prozess (Mehrzahl)
PVC	Polyvinylchlorid
RMSD	root mean square deviation, Standardabweichung
s	Sekunde
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Übers.	Übersetzer
u.a.	unter anderem

U/min	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
V.	Vene
Vv.	Venen
v.a.	vor allem
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vol%	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel
∅	Durchmesser
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
§	Paragraf
%	Prozent
± STABW	Standardabweichung
± SEM	Standardfehler

12 Danksagung

Nach Abschluss dieser Doktorarbeit bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Univ.- Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig- Maximilians- Universität München.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Univ.- Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs, Direktor des Instituts für Anästhesiologie der Technischen Universität München, Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie der Technischen Universität München und Fau PD Dr. med. Bettina Jungwirth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas.

Meiner wunderbaren Betreuerin Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann möchte ich für ihre unermüdliche Unterstützung, Motivation und Engelsgeduld, die stets hervorragende Beratung und konstruktive Kritik, das unermüdliche und immerzu rasche Korrekturlesen während der Anfertigung dieser Arbeit und ihren permanenten Rückhalt einen ganz besonderen Dank aussprechen. Danke Kristine!

Ein großer Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden Lisa Auster, Susan Vlachakis und Julia Scheer für ihre stete Unterstützung, Hilfsbereitschaft, die Aufmunterungen und die stets gute Zusammenarbeit und den Spaß den ich mit Euch haben konnte. Ebenso danke ich Frau Dr. med. vet. Simone Denzler für Ihre tatkräftige Motivation und Unterstützung, besonders am Anfang meiner Doktorandenzeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern für die stets gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Auch Herrn Sepp Straßmair und Frau Doris Droese möchte ich meinen Dank für die freundliche Unterstützung aussprechen.

Und zu guter Letzt möchte ich noch jenen danken, ohne deren Unterstützung und ständigen Ansporn diese Doktorarbeit wohl niemals zustande gekommen wäre: meiner lieben Oma Schabs, Dir, liebe Heidi und vor allem meinen lieben Eltern Annemarie und Alfred. Ich danke Euch, dass ihr mir durch Eure Geduld, Eure moralische und Eure finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren, um nicht zu sagen im letzten Jahrzehnt, meinen Traum, Tierarzt zu werden, ermöglicht habt. Dafür danke ich Euch von ganzem Herzen!

Und zum Schluß: Danke Dominik!